

Bedeutung der epithelialen Apoptose in der Pathogenese des septischen Multiorganversagens

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Madeleine Masuch
geboren am 30.06.1979

Gutachter

1.
2.
3.

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
a	aktiviert
A.	<i>Arteria</i>
ACCP	<i>American College of Chest Physicans</i>
Ag	Antigen
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i> (Verfahren zur Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit)
ARDS	<i>Acute (Adult) Respiratory Distress Syndrome</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bcl	<i>B-cell-lymphoma</i>
BE	Basenüberschuss
BH	Bcl-2-Homologie
Ca ⁺⁺	Calcium
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i>
Caspase	<i>cysteinyl aspartate-specific proteinase</i>
C5a	Komplementkomponente
CD	<i>Cluster of differenciation</i>
cJNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
Ck18Asp396	Spaltprodukt des Zytokeratin 18 = M30
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPRA	System zur Erstellung elektronischer Patientenakten
Cyt c	Cytochrom c
DcR	<i>decoy receptor</i> =Scheinrezeptor
DD	<i>death domain</i>
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>Death Receptor</i> (Todesrezeptor)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbend Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ET-1	Endothelin-1
F	<i>female</i> weiblich
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>
FAN	<i>factor associated with neutral spinghomyelinase</i>
Fas	<i>Fibroblast associated</i>
FasL	Fas Ligand
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FLICE	<i>Fas-linked interleukin converting enzyme</i> = Procaspase 8
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>

FSU	Friedrich Schiller Universität
GCS	GLASGOW – <i>coma-scale</i>
Gpt/l	Gigapartikel/Liter
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
I-CAD	Inhibitoren der Caspase-aktivierten DNase
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- α	Interferon α
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
ITS	Intensivstation
K ⁺	Kalium
kDa	kiloDalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LMP	<i>Lysosomal-membrane permeabilization</i>
LT- α	Lymphotoxin α
M	<i>male</i> männlich
M30	Neoepitop, das aus Cytokeratin 18 entsteht
MAP	mittlerer arterieller Druck
MARS	<i>Molecular adsorbent recirculating system</i>
mFas	Membran-gebundenes Fas
mFasL	Membran-gebundener FasLigand
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOF- <i>score</i>	<i>Multiple Organ Failure score</i> (Verfahren zur Beurteilung der Organfunktion)
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MOV	Multiorganversagen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MTA	Medizinisch technische(r) Assistent(in)
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B (Transkriptionsfaktor)
NO	Stickstoffmonoxid
O ⁻	Sauerstoffradikal

OA	Oberarzt
OH ⁻	Hydroxidion
OPG	Osteoprotegrin
OT	Objektträger
p	Statistische Kenngröße, Signifikanzniveau
p53	Tumorsuppressorgen
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	Pufferlösung zur Immunhistochemie
p _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCD	<i>programmed cell death</i> = Apoptose
PD	Privatdozent
PLA2	Phospholipase A2
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
sFas	lösliches (<i>soluble</i>) Fas
sFasL	löslicher (<i>soluble</i>) Fas Ligand
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low isoelectric point</i>
SOFA	<i>Sepsis Related Organ Failure Assessment</i>
sTRAIL	löslicher (<i>soluble</i>) TNF-related apoptosis-inducing ligand
tBid	<i>truncated Bid</i> (aktivierte Form von Bid)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TL1	<i>TNF-like factor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TNF-SF	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIS	Pufferlösung zur Immunhistochemie
TNEL	<i>Tdt-mediated dUTP nick end labeling</i>
U	Unit - Einheit zur Messung von Enzymaktivitäten (entspricht einem Substratumsatz von 1 μ mol/l)
V.	<i>Vena</i>
VEGI	<i>vascular endothelial growth inhibitor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Zur Geschichte der Sepsis	3
2.2 Definitionen	3
2.3 Epidemiologie der Sepsis und des Multiorganversagens	4
2.3.1 Inzidenz und Sterblichkeit	4
2.4 Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens	5
2.4.1 Infektion – Immunzellaktivierung – Wirtsantwort - Organdysfunktion	5
2.4.2 Weitere pathogenetische Grundlagen	6
2.5 Apoptose	8
2.5.1 Definition und Bedeutung	8
2.5.2 Morphologie des Zelltodes	9
2.5.3 Auslöser des programmierten Zelltodes	11
2.5.4 Intrinsischer Weg der Apoptose	11
2.5.4.1 Mitochondrial-initiierte Apoptose	11
2.5.4.2 Lysosomal-initiierte Apoptose	13
2.5.4.3 ER-Stress-initiierte Apoptose	14
2.5.5 Extrinsischer Weg / Rezeptor-vermittelte Apoptose	15
2.5.6 Gemeinsame Endstrecke – die Caspasen-Kaskade	16
2.5.7 Bcl-2-Proteinfamilie	17
2.5.8 Bedeutung der Apoptose in Sepsis, MODS und MOV	18
2.6 Bedeutung der Apoptosemarker	21
2.6.1 Fas/mFas/sFas	21
2.6.2 FasLigand (FasL, Apo1L), mFasL, sFasL	21
2.6.3 TRAIL (Apo2L)	22
2.6.4 Cytochrom c	23
2.6.5 M30	23

3.	Ziele der Arbeit/Fragestellung	24
4.	Material und Methoden	25
4.1	Beschreibung der Planung und Durchführung der Studie	25
4.1.1	Studiendesign	25
4.1.2	Studienbeteiligte	25
4.1.3	Datenerhebung	25
4.1.4	Datenbank Microsoft® Access 2000	26
4.1.5	Patienteneinschlusskriterien	26
4.1.6	Definitionen SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Leberversagen	27
4.1.6.1	SIRS (<i>Systemic Inflammatory Response Syndrom</i>)	27
4.1.6.2	Sepsis	27
4.1.6.3	Schwere Sepsis	28
4.1.6.4	Septischer Schock	28
4.1.6.5	Leberversagen	28
4.1.7	Zusammensetzung der Patientenkollektive	28
4.1.8	Beurteilung der Patienten mit Score -Systemen	29
4.1.8.1	SOFA- Score	29
4.1.8.2	GLASGOW- <i>Coma-Scale</i>	30
4.2	ELISA - <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	31
4.2.1	Allgemeines Prinzip der ELISA-Testsysteme	31
4.2.2	<i>human</i> TRAIL/TFSF10 <i>Immunoassay</i>	34
4.2.3	<i>human</i> sFas <i>Immunoassay</i>	34
4.2.4	<i>human</i> sFasL <i>Immunoassay</i>	34
4.2.5	M30/Ck18Asp396 Apoptosense™ ELISA	35
4.2.6	Cytochrom c ELISA <i>Kit</i>	35
4.3	Immunhistochemie	36
4.3.1	Probengewinnung und –vorbereitung	36
4.3.2	Immunhistochemische Färbung	36
4.4	Statistik	38

5	Ergebnisse	39
5.1	Allgemeines	39
5.2	Übersicht	40
5.3	Zeitlicher Verlauf der Serumspiegel der Apoptosemarker	43
5.4	Apoptosemarker in Korrelation zu den SOFA-Subscores	44
5.4.1	sFas	45
5.4.2	sFasL	47
5.4.3	TRAIL	49
5.4.4	M30	5
5.5	Immunhistologie der Leberbioptate	5
6	Diskussion	5
6.1	Methodenkritik	5
6.1.1	Wahl der Apoptosemarker	5
6.1.2	Nachweis der Apoptosemarker mit ELISA und Immunhistochemie	5
6.2	Bedeutung der Apoptose beim septischem Multiorganversagen	8
6.2.1	Epitheliale Apoptose lässt sich anhand des M30 nachweisen	9
6.2.2	Die Apoptose - ein streng reguliertes Selbstmordprogramm der Zelle	9
6.2.3	Schwerste Sepsis führt zu Apoptose von Hepatozyten	10
6.2.4	Die Hepatozytenapoptose wird wahrscheinlich auf intrinsischem Weg initiiert	10
6.2.5	Veränderung der sTRAIL-Expression beim septischen Multiorganversagen	10
6.2.6	Veränderung der sFas/sFasL-Expression beim septischen Multiorganversagen	10
7	Schlussfolgerungen	10
8	Literaturverzeichnis	11
9	Anhang	11
	Ehrenwörtliche Erklärung	11
	Lebenslauf	11
	Danksagung	11

1. Zusammenfassung

Sepsis und Multiorganversagen (MOV) sind trotz modernster Möglichkeiten der Intensivmedizin und einem enormen Wissenszuwachs auf diesem Gebiet nach wie vor durch eine hohe Sterblichkeit gekennzeichnet. Obgleich bestimmte Risikofaktoren prädisponierend wirken, ist die Sepsis nicht allein eine Erkrankung alter oder morbiditer Menschen. Vielmehr sind auch junge, gesundheitlich kaum beeinträchtigte Patienten betroffen (BRUNKHORST, 2005). Neben medizinischen Problemen stellt die intensivstationäre Betreuung der Erkrankten ein erhebliches sozioökonomisches Problem dar (BRUN-BUISSON, 2003; BRUNKHORST, 2005).

Die Wissenschaft hat in ihren Bemühungen um die Entschlüsselung der pathophysiologischen Grundlagen ein facettenreiches Krankheitsbild aufgedeckt. Abweichungen von physiologischen Vorgängen sind auf nahezu allen Ebenen zu verzeichnen (z.B.: genetische Veränderungen, Störungen des Immun-, Zytokin-, Gerinnungs- und Hormonnetzwerkes). Ein relativ junger Forschungsschwerpunkt konzentriert sich auf die Bedeutung der Apoptose. In diesem genetisch determinierten Prozess, der auch als programmierter Zelltod (PCD) bezeichnet wird, kommt es zum geregelten Untergang und Abbau der Zelle. Beim Gesunden bildet sie Grundlage einer geregelten Embryogenese, der Gewebshomöostase und der Immunfunktion. Das Signal zur Einleitung des programmierten Zelltodes erhält die Zelle z.B. über die Bindung eines Liganden an zellständige Todesrezeptoren (z.B.: Fas). Dies ist der sogenannte extrinsische Weg. Im Gegensatz hierzu kann das Signal auch vom Zellinneren, wie es beispielsweise nach schwerer DNA-Schädigung der Fall ist, ausgehen. Dieser als intrinsischer Weg bezeichnete Vorgang involviert primär Zellorganellen, wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum (ER) und Lysosomen.

Patienten im Vollbild der Sepsis zeigen Veränderungen des Ablaufs der Apoptose bestimmter Zellpopulationen. Während dieser Sachverhalt gesichert zur Dysregulation der Immunantwort im Rahmen der Sepsis beiträgt (MARSIK, 2003), wird die Bedeutung des PCD für das Versagen solider Organe kontrovers diskutiert (OBERHOLZER, 2001; DE FREITAS, 2004). Ein Ziel dieser Arbeit war daher zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Serumspiegeln bestimmter Apoptose-regulierender Proteine aus der Tumornekrosefaktor- (TNF) / TNF-Rezeptor-Familie (extrinsisch), bzw. Cytochrom c (intrinsisch) und der Dysfunktion bestimmter Organsysteme besteht. Im Mittelpunkt unseres Interesses stand hierbei vor allem das septische Leberversagen.

Zur Verifizierung des Apoptosegrades epithelialer Zellen, zu denen unter anderem die Hepatozyten zählen, wurde M30 im Serum und exemplarisch in drei Leberbiopsaten

gemessen. M30 ist ein Spaltprodukt des Zellskelettbestandteils Cytokeratin-18 das in der frühen Phase der Apoptose als hochspezifischer Marker auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Methodik: Nach Genehmigung der zuständigen Ethikkommission und Einverständnis der Angehörigen wurden die Apoptose-spezifischen Proteine im Serum von Patienten mit Sepsis (n=5) oder postoperativer systemischer Entzündungsreaktion nicht-infektiöser Genese (SIRS) (n=1) sowie gesunden Kontrollen (n=10) mittels ELISA quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte durch Berechnung mittels ANOVA (*One Way Analysis of Variance* und *Two Way ANOVA*) jeweils gefolgt von einer *post-hoc*-Adjustierung für multiples Testen nach Student-Newman-Keuls mit einer kommerziellen Software (SigmaStat). **Ergebnisse:** Die Serumkonzentrationen löslicher Marker der TNF/TNFR-Familie (sFas, sFasL, TRAIL) waren für sFas bei septischer Genese höher, verglichen mit denen nicht-infektiöser systemischer Entzündung. Nur die Serumkonzentrationen von sFas überschritten die Werte von gesunden Probanden, wohingegen die Serumkonzentrationen von sFasL und TRAIL deutlich darunter lagen. Eine Zunahme des Caspasespaltproduktes M30 im Serum war lediglich bei schwerstem Multiorganversagen zu beobachten. Eine exemplarische Korrelation der Apoptosekaskade mit dem Ausmaß der Leberdysfunktion zeigte ebenfalls eine erhöhte Generierung von M30 nur bei schwerem Leberversagen, dann allerdings in hohen Konzentrationen. Dabei wurde die Bildung des Neoepitopes von einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom-c begleitet. Dem gegenüber waren die sFasL-Serumkonzentrationen nahezu unverändert. Bei 3 Patienten mit fulminantem Leberversagen wurde zu differentialdiagnostischen Zwecken eine Leberbiopsie durchgeführt. Die immunhistochemische Untersuchung der Biopate zeigte eine erhöhte M30-Expression sowie gesteigerte Aktivität an aktivierter Caspase 3, einem Vollstreckerenzym der Apoptose. **Interpretation:** Der PCD (*programmed cell death*, Apoptose), welcher über den intrinsischen/mitochondrialen Weg initiiert wird, scheint mit der Schwere des Organversagens zu korrelieren und einen wesentlichen Beitrag zum schweren Organversagen (z.B. der Leber) zu leisten. Eine Protektion von Organen gegenüber dem apoptotischen Zelltod bei moderater Organdysfunktion scheint aufgrund der Ergebnisse möglich. Die Bestimmung der Serumkonzentration Apoptose-spezifischer Proteine eignet sich zur indirekten Quantifizierung der Apoptoseaktivität bei Patienten mit SIRS und Sepsis. Klinisch könnte sie für die Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität hilfreich sein, sowie neue Einblicke in die Bedeutung der Apoptose bei der Pathogenese sowie die Entwicklung neuer Therapiestrategien ermöglichen.

2. Einleitung

2.1 Zur Geschichte der Sepsis

Bereits im Jahre 400 vor Christus beschrieb HIPPOKRATES ein Fieber, das durch eine faulende Materie verursacht wird. IGNAZ SEMMELWEIS erkannte 1847 die Ursache der Puerperalsepsis und es gelang ihm durch Einführung der Händedesinfektion mit Chlorwasser die Sterblichkeit der Wöchnerinnen erheblich zu senken. Entscheidende Fortschritte erbrachten die Etablierung der Mikrobiologie durch KOCH und PASTEUR, die Endotoxinforschung verbunden mit Namen wie PFEIFER, CENTANNI und WESTPHAL und die Aufklärung des Mediator- und Zytokinnetzwerkes in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts. Auf SCHOTTMÜLLER (1914) geht eine der ersten Sepsisdefinitionen zurück, die das Vorhandensein vitaler Bakterien als *conditio sine qua non* voraussetzt. Die weitere Aufklärung der Pathophysiologie und Genese der Sepsis machte die Einführung neuer Begriffe nötig. Die aktuellsten Definitionen zeigt Tabelle 1.

2.2 Definitionen

Die Diagnose einer Sepsis verlangt das Vorliegen einer Infektion und die Erfüllung von wenigstens 2 von 4 Kriterien des systemischen inflammatorischen **Response**-Syndroms, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Liegt zusätzlich mindestens eine infektionsbezogene Organdysfunktion vor, spricht man von schwerer Sepsis. *Per definitionem* wird die Insuffizienz eines Organs als Organdysfunktion, das Zusammentreffen dieser Situation für 2 und mehr Organe als Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) bezeichnet. Kommt es schließlich zum Versagen von 2 oder mehr Organen besteht ein Multiorganversagen (MOV)(BONE, 1996).

Infektion	Entzündliche Gewebereaktion auf Mikroorganismen oder Invasion von Mikroorganismen in normalerweise steriles Gewebe.
Bakteriämie	Vorhandensein vitaler Bakterien im Blut. Die Anwesenheit von Pilzen, Viren, Parasiten und anderen Pathogenen in der Blutbahn sollte entsprechend bezeichnet werden.
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome: systemisch-entzündliche Reaktion auf verschiedene schwere klinische Insulte, charakterisiert durch 2 oder mehr der folgenden Symptome: 1. Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, 2. Herzfrequenz $>90/\text{min}$, 3. Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $p_a\text{CO}_2 < 32\text{mmHg}$, 4. Leukozyten $>12.000/\text{mm}^3$ oder $<4.000/\text{mm}^3$, oder $>10\%$ unreife (stabförmige) Formen

CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i> : kompensatorisches antiinflammatorisches Reaktionssyndrom, das sich im Anschluss an die proinflammatorische Phase als Anergie, als erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen oder als beides manifestiert.
Sepsis	Systemische Reaktion auf eine Infektion, z.B. charakterisiert durch 2 oder mehr der folgenden, durch die Infektion hervorgerufenen Symptome: <ol style="list-style-type: none">1. Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$,2. Herzfrequenz $>90/\text{min}$,3. Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{p}_a\text{CO}_2 < 32\text{mmHg}$,4. Leukozyten $>12.000/\text{mm}^3$ oder $<4.000/\text{mm}^3$, oder $>10\%$ unreife (stabförmige) Formen
schwere Sepsis	Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie. Minderdurchblutung und Durchblutungsstörungen können beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage.
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i> : Deutlich geänderte Organfunktion bei Akutkranken, dass die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann.
septischer Schock	Sepsisinduzierter Schock mit Hypotonie trotz adäquater Volumensubstitution, einhergehend mit Hypoperfusionszeichen oder Organdysfunktionszeichen; letztere können beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage. Patienten, die infolge einer Therapie mit inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen nicht mehr hypotensiv sind, aber dennoch Zeichen der Hypotension oder Organdysfunktion aufweisen, werden trotzdem dem Stadium des septischen Schocks zugeordnet.

Tabelle 1: **Aktuelle Definitionen von Sepsis, SIRS und sepsisassoziierten Erkrankungen** beruhend auf dem Beschluss der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) 1992.

2.3 Epidemiologie der Sepsis und des Multiorganversagens

2.3.1 Inzidenz und Sterblichkeit

Deutschlandweit sterben täglich etwa 164 Patienten an Sepsis. Diese stellt damit die dritthäufigste Todesursache nach koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt dar. Hierzulande erkranken pro Jahr etwa 154.000 (216/100.000) Einwohner, davon 75.000 (110/100.000) an schwerer Sepsis bzw. septischem Schock. Je nach Schweregrad der Erkrankung kann die Mortalität bis zu 54% betragen (BRUNKHORST, 2005).

Dem MOV liegt in 60 - 90% der Fälle eine Sepsis zugrunde. Trotz beherrschbarem Einzelorganversagen geht das etablierte MOV mit einer schlechten Prognose einher. So enden etwa ein Drittel der Sepsisfälle mit dem Tod durch MOV (ANGUS, 2001).

Am häufigsten sind das Nieren- (30-31%) und Lungenversagen (28-31%). Bei 19-22% der Patienten werden Leberfunktionsstörungen beobachtet (BAKKER, 2004).

Trotz Fortschritten in der Intensivtherapie, die zur Abnahme der Mortalität beigetragen haben, führt die zunehmende Inzidenz insgesamt zu einer steigenden Zahl versterbender Patienten (MARTIN *et al.*, 2003; BRUN-BUISSON, 2004). Die Zunahme der Inzidenz findet ihre Wurzeln in Grunderkrankungen, iatrogenen Immundefizienzen und dem demografischen Wandel, der mit einer immer älter werdenden Bevölkerung einhergeht. Zum anderen begünstigen die zunehmende Invasivität diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, Antibiotikaresistenzen und multiresistente Keime die Entstehung septischer Komplikationen (BRUN-BUISSON, 1995; KOZIEL, 1995; MCCLAINE, 1996).

2.4 Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens

2.4.1 Infektion – Immunzellaktivierung - Wirtsantwort – Organdysfunktion

Sepsis wird durch Invasion von Mikroorganismen und/oder deren Produkten, den sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), in die Blutbahn verursacht. Unter PAMPs werden z.B. Exotoxine, bakterielle DNA sowie virale Bausteine subsumiert. Diese werden von spezifischen Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRR) immunkompetenter Zellen gebunden. Über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden resultiert eine stereotype inflammatorische Wirtsantwort (SIRS) mit der Entstehung infektionsortferner Organschäden bis hin zum MOV (BOCHUD, 2003).

Ein Mitglied der PRR sind die *Toll-like-Rezeptoren*, die zuerst bei *Drosophila melanogaster* beschrieben wurden. Ihre Aktivierung auf Monozyten/Makrophagen führt zur Expression von Genen, die proinflammatorische Zytokine codieren. Hierzu zählt man z.B. die als Hauptmediatoren der Sepsis geltenden Zytokine TNF- α und IL-1. Ihre Ausschüttung (*respiratory burst*) zieht die Freisetzung sekundärer Zytokine (IL-6, -8, -10) und Mediatoren nach sich, die mit ihren vielseitigen, teils synergistischen, teils antagonistischen Effekten die inflammatorische Antwort modulieren (RIEDEMANN, 2003).

Während früher die Wirkungen eingedrungener Mikroorganismen als Hauptursache der systemischen Entzündungsreaktion galten, wird heute die inadäquate Reaktion des unspezifischen Immunsystems als wichtiger pathogenetischer Faktor angesehen (LIVINGSTON, 1995; BONE, 1996).

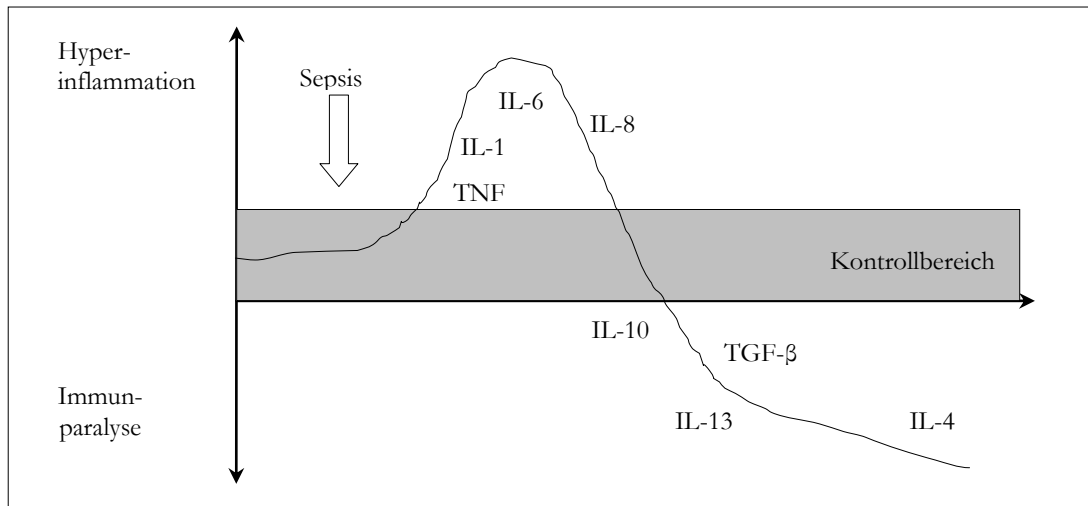


Abbildung 1: **Hypothetischer zeitlicher Verlauf der Immunreaktion bei Sepsis**
modifiziert aus "Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen" WERDAN und
SCHUSTER, Springer-Verlag, 3. Auflage

Die physiologische Antwort auf eine Infektion besteht zunächst in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Durch negative Rückkopplung kommt es im Verlauf zur Umschaltung auf antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF, IL-4, IL-13). Dies begrenzt das Ausmaß der Entzündung (Kontrollbereich) und ermöglicht regenerative Prozesse. Liegt eine Sepsis vor, kann das sinnvolle Reaktionsniveau jedoch überschritten werden: die generalisierte Entzündungsreaktion während der hyperinflammatorischen Frühphase kann dann zu fulminantem Organversagen führen. Die kompensatorische Rückkopplung ist ebenfalls übersteuert und leitet eine hyporeaktive Sekundärphase (Immunparalyse) ein, die wiederum die Ausbreitung der Infektion ermöglicht bzw. neuen Infektionen Vorschub leistet (BONE, 1996; BOCHUD, 2003; RIEDEMANN, 2003; OBERHOLZER, 2001). Man spricht daher von einer bipolaren Störung des unspezifischen Immunsystems (Abbildung 1).

2.4.2 Weitere pathogenetische Grundlagen

Eine Modulation der Wirtsantwort mit erhöhtem Risiko an schwerer Sepsis zu erkranken wird auch bei bestimmten genetischen Defekten, wie dem TNF- α -Polymorphismus 308 G/A beobachtet (SIPAHI, 2006). Bereits 1988 zeigte SORENSEN, dass das relative Risiko eines leiblichen Kindes, an einer Infektion zu versterben, um den Faktor 5,8 erhöht war, wenn der Tod eines Elternteils vor dem 50. Lebensjahr durch Sepsis eintrat (SORENSEN, 1988). Einen Beitrag hierzu könnte die individuelle Antwort des Organismus auf Stress leisten. So wird bei Septikern eine dysregulierte Freisetzung von Kortisol, Insulin und

Vasopressin beobachtet, die die Prognose des Krankheitsbildes negativ beeinflusst (BERGHE, 2001; PATEL, 2002; KLINZING, 2003; VANHOREBEEK, 2005).

Das veränderte Zusammenspiel sezernierter Zytokine, Mediatoren und Hormone beeinflusst neben den primär defensiven Kaskadensystemen (Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein/Kinin-System) auch die Integrität der Endorgane, wie Lunge, Niere, Herz oder dem Hepatosplanchnikusgebiet (BERNARD, 2001).

Hervorzuheben sind hierbei die Mediator-induzierten Mikrozirkulationsstörungen. So kommt es bei septischen Patienten zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung mit Bildung obstruktiver Fibrinthromben durch gesteigerte Expression des *tissue factors* (CREASEY, 2001). Aggravierend kommt es zur weiteren Verlegung der Strombahn mit aktivierten Leukozyten, die über verstärkt exprimierte Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, P-Selektin) am Endothel festgehalten werden (ESMON, 2004).

Auch die gesteigerte Synthese stressinduzierbarer vasoaktiver Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Endothelin-1 (ET-1) ist an der Genese der Distributionsstörung beteiligt (BAUER, 1997; RENSING, 1999, 2001, 2002; BATEMANN, 2003). Eine gestörte Sauerstoffaufnahme (septisches Lungenversagen) und -utilisation auf mitochondrialer Ebene kann die nutritive Versorgung im Rahmen der Sepsis zusätzlich gefährden (COBB, 2000; FINK, 2001; PAXIAN, 2003). Die resultierende Hypoxie kann insbesondere in vulnerablen Gebieten, wie den Zottenspitzen des Darmes, zum Zelluntergang führen. Dies begünstigt wiederum den Eintritt von PAMPs in den Organismus, ein als Translokation bezeichneter Vorgang (MEIER-HELLMANN, 1997; LICHTMANN, 2001). Definitionsgemäß versteht man hierunter den Übertritt vitaler/abgetöteter Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte aus dem Darm oder der Lunge in Blut- und Lymphsystem. Die eingedrungenen PAMPs aktivieren Zellen des angeborenen Immunsystems und setzen einen *Circulus vitiosus* aus Zytokinfreisetzung und -wirkung in Gang (WOODCOCK, 2000).

Am Beispiel des septischen Leberversagens sind in Abbildung 2 wichtige pathogenetische Faktoren zusammengetragen.

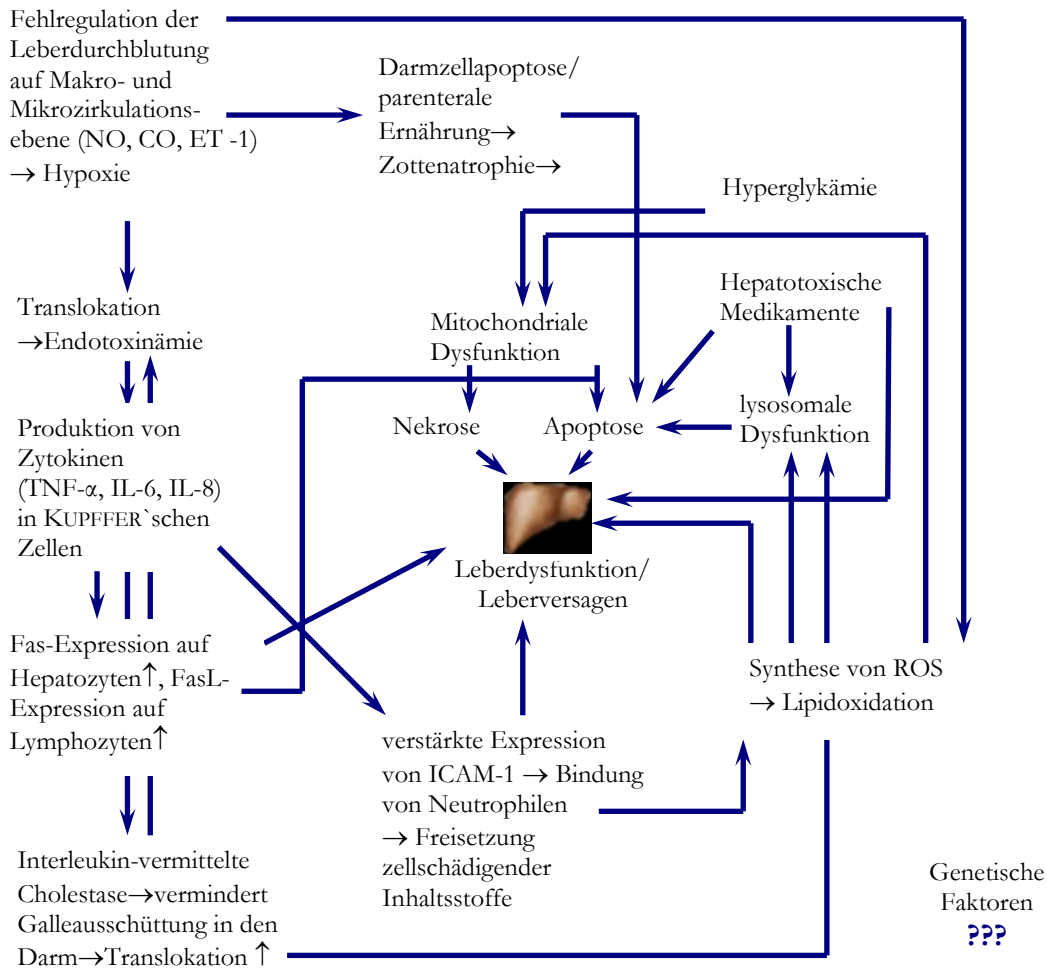


Abbildung 2: Pathogenese des septischen MOV am Beispiel der Leberversagens

Auf den Beitrag der Apoptose zur Pathogenese der Sepsis und des MOV soll aus systematischen Gründen später eingegangen werden (siehe Abschnitt 2.5.8).

2.5 Apoptose

2.5.1 Definition und Bedeutung

Der Begriff des programmierten Zelltodes (PCD), auch Apoptose genannt, ist griechischen Ursprungs ($\alpha\pi\omicron\tau\tau\omega\sigma\iota\varsigma$: das Abfallen). Er beschreibt das Fallen einzelner Blätter eines Baumes. Gleichsam dieser Blätter können durch Apoptose einzelne Zellen aus dem Zellverband entfernt werden. Dies ist beispielsweise in der Embryogenese, der Gewebshomöostase oder auch zum Schutz des Organismus vor autoreaktiven

Lymphozyten und mutierten Zellen (z.B. Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen) von Bedeutung (MEIER, 2000; EVAN, 2001; REED, 2002).

2.5.2 Morphologie des Zelltodes

Nach Anlaufen des PCD lässt sich innerhalb weniger Minuten ein Schrumpfen des Zellkörpers beobachten, die Zellkontakte lösen sich (*Anoikis*) (LEIST, 2001). Der Verlust der Membranstabilität führt zunächst zu bläschenförmigen Ausstülpungen der Zellmembran (*Zeiose*), die schließlich in der Bildung apoptotischer Körperchen resultiert (KERR, 1974). Typisches Merkmal der Apoptose ist die Chromatinkondensation und die Degradation der DNA durch Endonukleasen (WYLLIE *et al.*, 1980). Während die intrazellulären Proteine enzymatisch, hauptsächlich durch Caspasen (*cysteiny* *aspartate-specific proteinases*), abgebaut werden, kommt es an der Zelloberfläche zum Erscheinen von Phosphatidylserin. Das Lipid wird durch benachbarte Zellen oder Makrophagen erkannt und regt diese zur Phagozytose an (FADOK *et al.*, 1992). Während des gesamten Vorgangs bleiben intrazytoplasmatische Substanzen kompartmentalisiert, weshalb die Apoptose nicht von einer Entzündungsreaktion begleitet wird. In neuerer Zeit gibt es allerdings Hinweise darauf, dass Makrophagen bei der Beseitigung apoptotischer Zellen zur Sekretion immunsupprimierender Botenstoffe stimuliert werden, was eine nachteilige Immunparalyse mit Ausbreitung der zugrundeliegenden Infektion zur Folge hätte (WESCHE, 2005).

In der Literatur wird der Apoptose die Nekrose (νεκρός: tot, abgestorben) gegenübergestellt. Diese Form des Zelltodes tritt ein, wenn die Schädigung zu groß oder die Energieversorgung der Zelle nicht ausreichend ist. Nekrotische Zellen nehmen, bevor es zur Lyse kommt, zunächst an Volumen zu (*Oncose*), da durch den Ausfall energieabhängiger Ionenpumpen (Na^+/K^+ -ATPase) Ionen und Wasser in die Zelle einströmen. Das Freiwerden zytosolischer Bestandteile, die hochreaktive Enzyme und Sauerstoffradikale enthalten, zieht regelmäßig entzündliche und immunologische Reaktionen nach sich. Dabei kann es auch zur Schädigung von Nachbarzellen kommen (LEIST, 2001). Abbildung 3 verdeutlicht wesentliche Unterschiede der beiden Zelltodformen.

Neben den morphologischen Mischformen, wie Apoptose- und Nekrose-ähnlichem Zelltod (DAUGAS, 2000; MATE, 2002), existiert eine dritte eigenständige Form, die Autophagozytose (*auto*: selbst, *phagein*: fressen). Ursprünglich dient sie der Überbrückung von Hungerphasen und der Elimination von geschädigten Zellorganellen. In Abhängigkeit

von ihrem Ausmaß kann sie auch als Zelltod in Erscheinung treten (LEVINE & KLIONSKY, 2004).

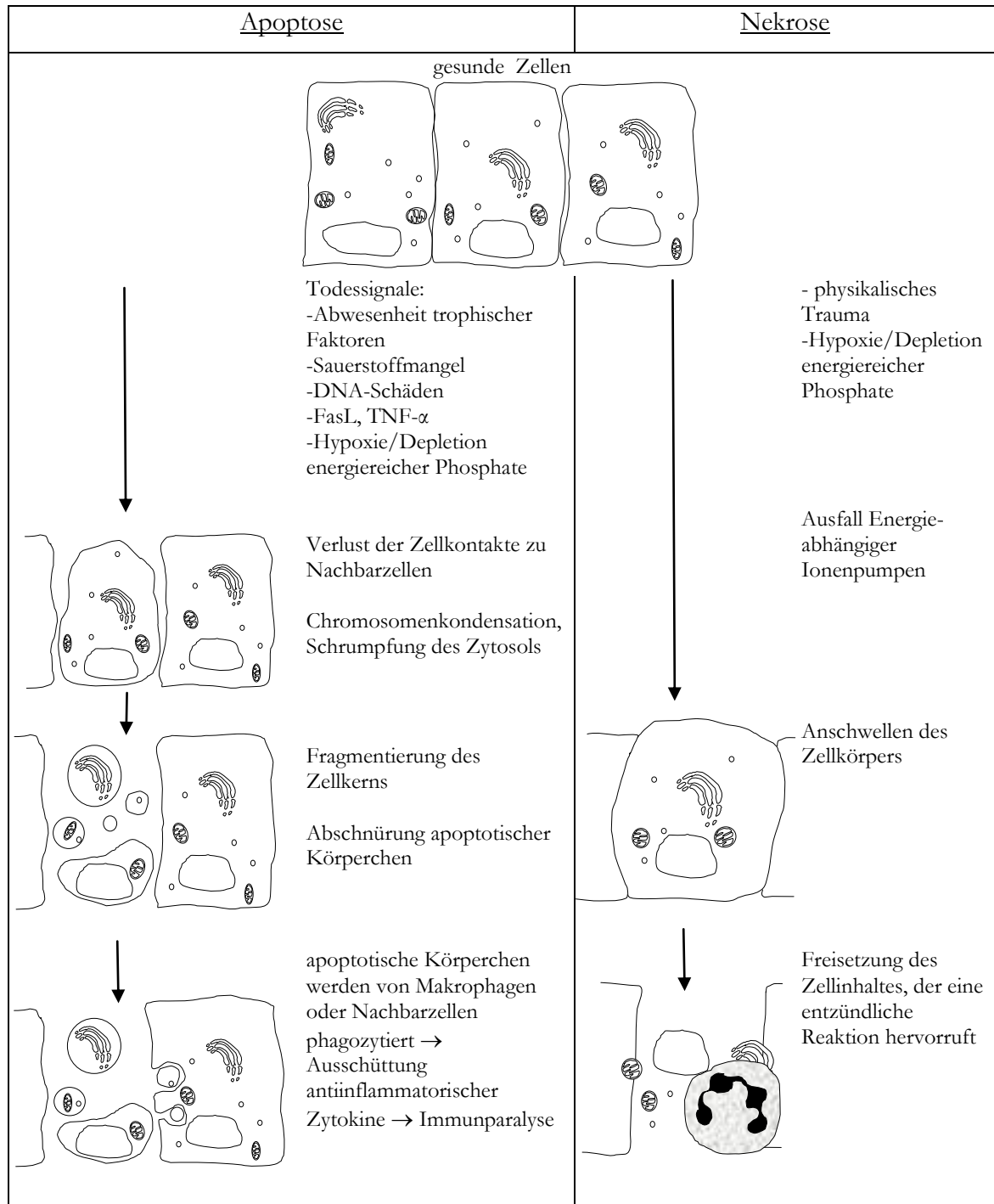


Abbildung 3: Zwei Arten des Zelltodes – morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose.

2.5.3 Auslöser des programmierten Zelltodes

Prinzipiell kann das Signal zur Einleitung der Apoptose von außerhalb (extrinsischer Weg) oder vom Inneren der Zelle (intrinsischer Weg) ausgehen. Extrinsische Signale umfassen beispielsweise die Aktivatoren von „Todesrezeptoren“, Chemotherapeutika und der Entzug von Wachstumsfaktoren. Zu den Auslösern der intrinsisch initiierten Apoptose zählen DNA-Schäden, reaktive Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und die Überexpression bestimmter Tumorsuppressorgene (KRAMMER, 1999). Ob eine Zelle letztlich apoptotisch wird, hängt dabei zusätzlich vom Differenzierungsgrad, der Zellzyklusphase und der Genaktivierung ab. Zwischen Rezeptor-, Mitochondrien-, Lysosomen- und ER-vermittelten Zelltodmechanismen bestehen weitreichende Verbindungen. Hierdurch wird eine Verstärkung des initialen Signals auf die ganze Zelle erreicht (HOLLER *et al.*, 2000; BRUNK, 2001). Im folgenden Abschnitt soll auf wesentliche Charakteristika der einzelnen Wege kurz eingegangen werden. Abbildung 9 auf Seite 23 gibt einen vereinfachten Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Signalwege.

2.5.4 Intrinsischer Weg der Apoptose

2.5.4.1 Mitochondrial-initiierte Apoptose

Durch Oxidation verschiedener Nährstoffe gewinnen Mitochondrien die Energie für alle lebensnotwendigen Prozesse der Zelle. Im Rahmen der Apoptose sind sie eng mit dem extrinsischen Weg vernetzt, aber auch ein Ausgangspunkt des intrinsischen Pfades.

Äußere und innere Mitochondrienmembran begrenzen den Intermembranraum, der verschiedene Stoffe beherbergt, von denen Cytochrom c der bekannteste Vertreter ist. Neben der Funktion als Atmungskettenenzym kommt ihm eine besondere Bedeutung als Effektormolekül der Apoptose zu.

Als Kernstück der mitochondrial initiierten Apoptose gilt die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Dieser Vorgang wird als MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) bezeichnet und führt zum Ausströmen intermembranös lokalisierter Stoffe ins Zytoplasma. Nach derzeitiger Datenlage sind im Wesentlichen Porenkomplexe aus proapoptotischen Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie für diese Durchlässigkeit verantwortlich (siehe Abschnitt 2.5.7) (KAUFMANN & HENGARTER, 2001; DANIAL 2004; HÄCKER, 2007). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die durch MOMP liberierten Moleküle und den Mechanismus, über welchen sie zum Zelltod

beitragen. Gelangt Cytochrom c ins Zytosol, induziert es die Oligomerisierung des Adapterproteins Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*). Nun wird Procaspase-9 an den entstehenden Apaf-1-Komplex rekrutiert - es entsteht das Apoptosom, ein hochmolekularer Komplex von ca. 700 kDa Molekulargewicht (CAIN *et al.*, 2002). Procaspase-9 wird dabei ATP-abhängig autoproteolytisch aktiviert und kann nachfolgend die Caspasen-Kaskade in Gang setzen.

Einer der wichtigsten Auslöser von MOMP sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Mitochondrien selbst sind die Hauptquelle dieser hochreaktiven Stoffe (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot). ROS entstehen hier im Zuge der oxidativen Phosphorylierung und reagieren in einer Art Kettenreaktion mit wichtigen Zellbausteinen. Die dadurch eingeschränkte Membranfluidität führt zur Reduktion lebensnotwendiger biologischer Prozesse. Einen Überblick über weitere Auslöser der mitochondrialen Apoptose gibt Abbildung 4.

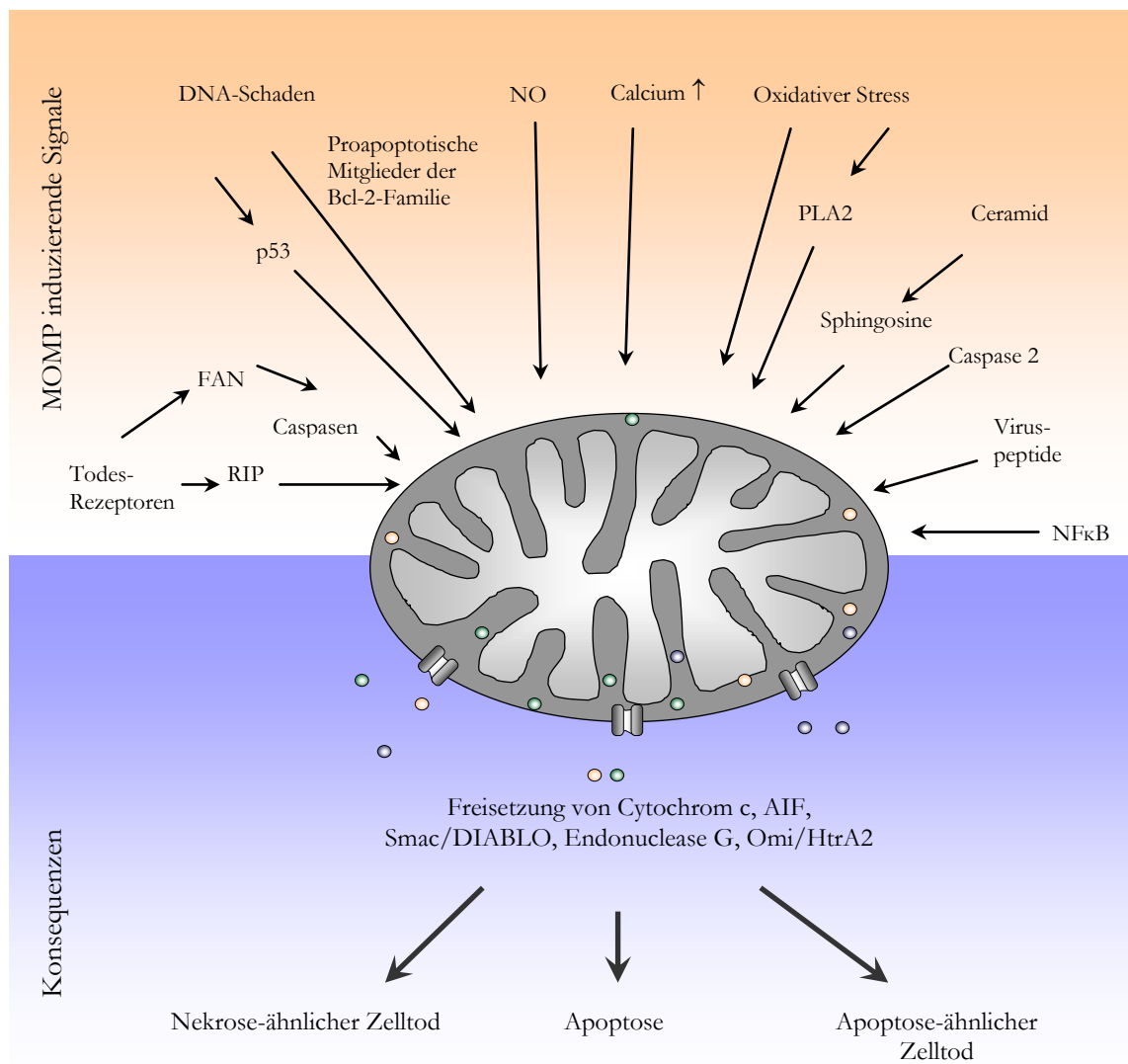


Abbildung 4: **Induktoren der Mitochondrialen-Außenmembran-Permeabilisierung (MOMP-) und Konsequenzen.** (ROBERTSON, 2004; LE BRAS, 2006).

Zum Schutz der Zelle unterliegt der Zelltod einer strengen Regulation und so existieren komplexe Sicherheitsmechanismen und Rückkopplungsschleifen. Beispielsweise kann das Apoptosom durch inhibitorische Proteine im Zytoplasma, die *inhibitor of apoptosis proteins*, (IAPs) gehemmt und so die Apoptose verhindert werden (SALVESEN, 2002). Durch MOMP gelangen jedoch auch Neutralisatoren der IAPs ins Zytoplasma, die wiederum eine Hemmung des Apoptosoms verhindern (Tabelle 2).

Molekül	Funktion
Cytochrom c	-Aktivierung von Procaspase 3 durch Bildung des Apoptosoms (Cytochrom c/Apaf-1/Caspase-9)
Smac/DIABLO	-Neutralisierung hemmender Effekte der IAPs → Caspasenaktivierung
Omi/HtrA2	-Neutralisierung hemmender Effekte der IAPs → Caspasenaktivierung
AIF	-Aktivierung von Procaspase 3 → Aktivierung weiterer Caspasen -AIF transloziert in den Zellkern → über einen noch unbekannten Mechanismus kommt es zur Chromatinfragmentation in 50 Basenpaar-lange Bruchstücke
Endonuclease G	Caspasen-unabhängige DNA-Fragmentierung

Tabelle 2: **Apoptogene Faktoren, die durch MOMP aus dem Intermembranraum freierwerden und deren Wirkungsweise.** (SUSIN *et al.*, 1999; CAIN, 2000; LI, 2001; GREEN & KROEMER, 2004).

2.5.4.2 Lysosomal-initiierte Apoptose

Die abgeschnürten Vesikel des GOLGI-Apparates (Lysosomen) verfügen über eine Vielfalt verschiedenster Enzyme, die essentielle Aufgaben in Apoptose, Autophagozytose und Infektabwehr erfüllen. Eine bedeutende Gruppe sind die Cathepsine. Interessanterweise teilen sie sich mit den Caspasen eine Vielzahl Zelltod-assoziiierter Substrate, wie die Caspasen selbst, Bid und zytosolische Phospholipase A2 (STOKA, 2001).

In Antwort auf verschiedene Stimuli, die in Abbildung 5 dargestellt sind, translozieren die Enzyme bei intakter Ultrastruktur ins Zytosol (BRUNK, 2001). Dieser Prozess wird äquivalent der mitochondrialen Porenformation als *lysosomal-membran permeabilization* (LMP) bezeichnet und gilt als Kern der lysosomal-initiierten Apoptose.

Die dabei liberierten Cathepsine, insbesondere das Cathepsin D, aktivieren proapoptotische Proteine, die die Verbindung zur mitochondrialen Apoptose darstellen (ROBERG, 2001; BIDERRE, 2003).

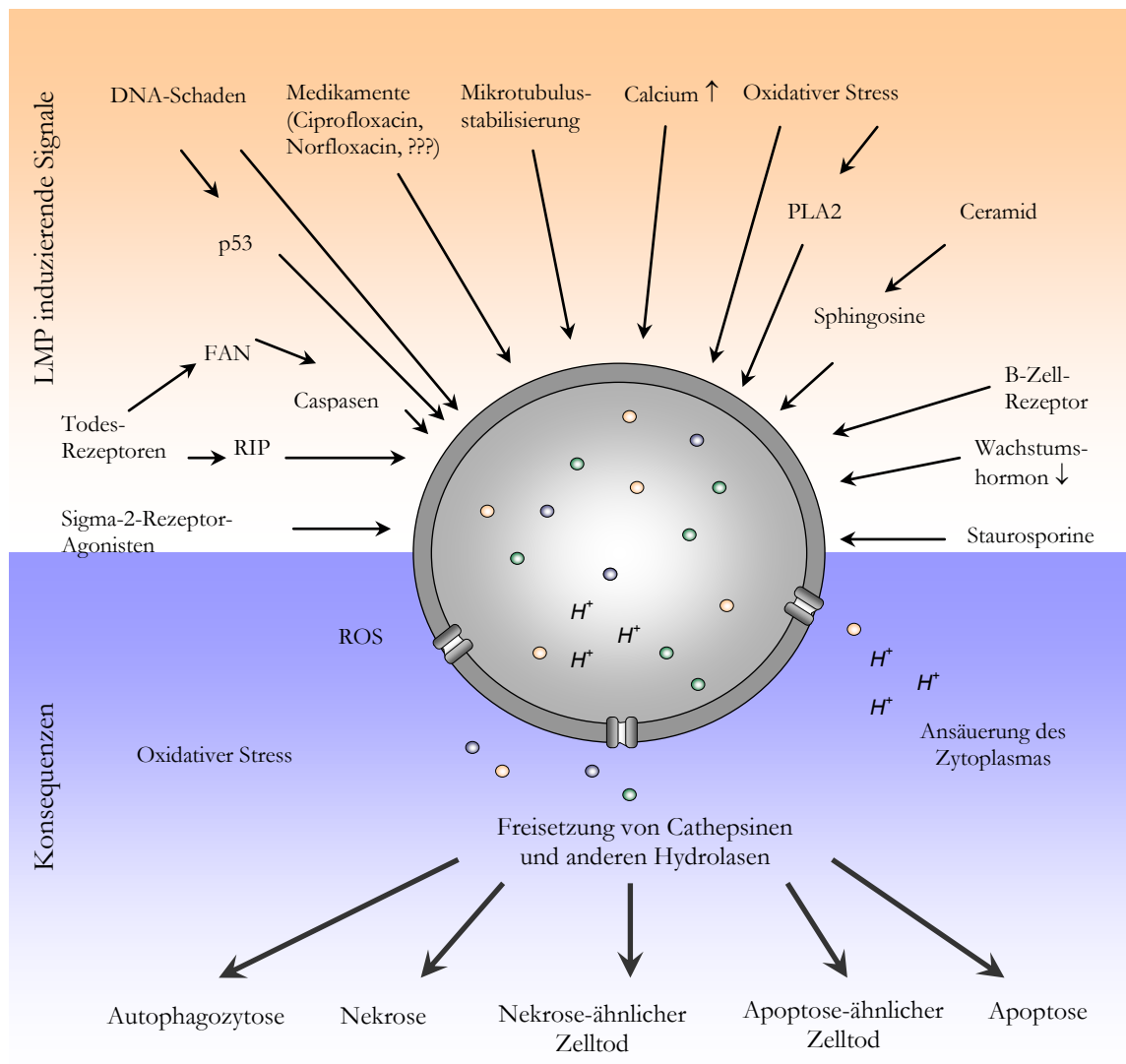


Abbildung 5: **Induktoren der lysosomalen Membran-Permeabilisierung (LMP) und Konsequenzen.** (modifiziert nach KROEMER & JÄÄTTELÄ, 2005) (BRUNK, 2001; YUAN *et al.*, 2002; BOYA, 2003; FEHRENBACHER, 2004).

2.5.4.3 ER-Stress-initiierte Apoptose

Synthese und Faltung sekretorischer, membranständiger, aber auch mitochondrialer Proteine sind wesentliche Funktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Für eine optimale Proteinfaltung werden hohe Ansprüche an das Zellmilieu gestellt. Hierzu zählen ausreichende ATP-Reserven, Ca⁺⁺ und eine Oxidations-fördernde Umgebung, die zur Formation der Disulfidbrücken benötigt wird (GAUT & HENDERSHOT, 1993). Als Konsequenz auf die hohen Anforderungen ist das ER besonders empfindlich gegenüber Stressoren wie ROS, NO, Toxinen und Veränderungen der Ca⁺⁺-Konzentration. Die

genannten Faktoren reduzieren die Kapazität des ER, Proteine zu falten, dies resultiert in einer Akkumulation ungefalteter Proteine. Der vorliegende Zustand wird als ER-Stress bezeichnet und kann bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern beobachtet werden.

Die Einleitung spezifischer Signalwege, die zusammengefasst als *unfolded protein response* bezeichnet werden, verfolgt zunächst das Ziel, den Stressor zu reduzieren und das Überleben der Zelle zu sichern (SCHRODER & KAUFMAN, 2005). Gelingt dies nicht, kommt es zur Einleitung des PCD. Auf molekularer Ebene bewirkt der unabwendbare ER-Stress eine Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (cJNK) (URANO, 2000) und die Induktion des CHOP-Gens (OYADOMARI, 2004). Beide verhindern die antiapoptotische Wirkung der Bcl-2-Proteine (BRECKENRIDGE, 2002; SCORRANO, 2003; BASSIK, 2004). Caspase 12, die als Schlüssel-Mediator der ER-induzierten Apoptose gilt, konnte bislang nur bei Nagetieren gefunden werden (SZEGEZDI, 2003). Das Gen, das für das gleichartige humane Enzym codiert, ist während der Evolution durch Mutationen verstummt.

2.5.5 Extrinsischer Weg / Rezeptor-vermittelte Apoptose

Dieser Pfad wird durch Ligandenbindung an membranständige Todesrezeptoren eingeleitet. Todesrezeptoren, eine Subfamilie der TNF-SF, sind durch eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne und die zytoplasmatische Todesdomäne, die die Transduktion des Apoptosesignals ermöglicht, charakterisiert (ASHKENAZI, 2002). Eine Auswahl der wichtigsten Mitglieder ist in Tabelle 3, ihr struktureller Aufbau in Abbildung 6 dargestellt.

Als Liganden kommen TNF- α , Fas Ligand (FasL), TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und andere Zytokine infrage. Interaktion des Rezeptors mit membranständigen oder löslichen Liganden (z.B. FasL) führt zur *Cluster*-Bildung und zur Assoziation der zytoplasmatischen Todesdomäne (DD = *death domain*) des Rezeptors mit im Zytoplasma befindlichen Adapterproteinen, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen (z.B. FADD (*Fas-associated death domain protein*)). Der Komplex aus Rezeptor und Adapterproteinen wird als „*death inducing signaling complex*“ (DISC) bezeichnet. Schließlich kommt es zur Rekrutierung von Procaspase 8, die durch die hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktiviert wird und durch Katalyse anderer Procaspasen die Caspasen-Kaskade anstößt (BORGERSON *et al.*, 1999). Ein Substrat der Caspase 8 ist das proapoptotische Bid, das in seine aktive Form, tBid (*truncated Bid*) überführt wird. tBid scheint u.a. an der Initiierung der MOMP beteiligt zu sein und könnte auf diesem Weg in einer mitochondrialen Amplifikationschleife zur Verstärkung des apoptotischen Signals führen (CORY &

ADAMS, 2002, DANIAL, 2004). Zusammenfassend sind die Apoptosepfade in Abbildung 9 Seite 23 dargestellt.

Rezeptor	Synonyme		Liganden
TNF-R1	DR1	-	TNF- α , LT- α
Fas	DR2	CD95, APO-1	FasL
-	DR3	- APO-2	TL1, VEGI
TRAIL-R1	DR4	-	TRAIL
TRAIL-R2	DR5	-	TRAIL

Tabelle 3: Übersicht über eine Auswahl wichtiger Rezeptoren mit Todesdomäne

Abkürzungen: TNF-R1 – Tumor-Nekrose Faktor-Rezeptor 1, LT- α – Lymphotoxin α , TRAIL-R –TRAIL-Rezeptor, DR – *death receptor*, TL1 – TNF-*like factor*, VEGI – *vascular endothelial growth inhibitor*

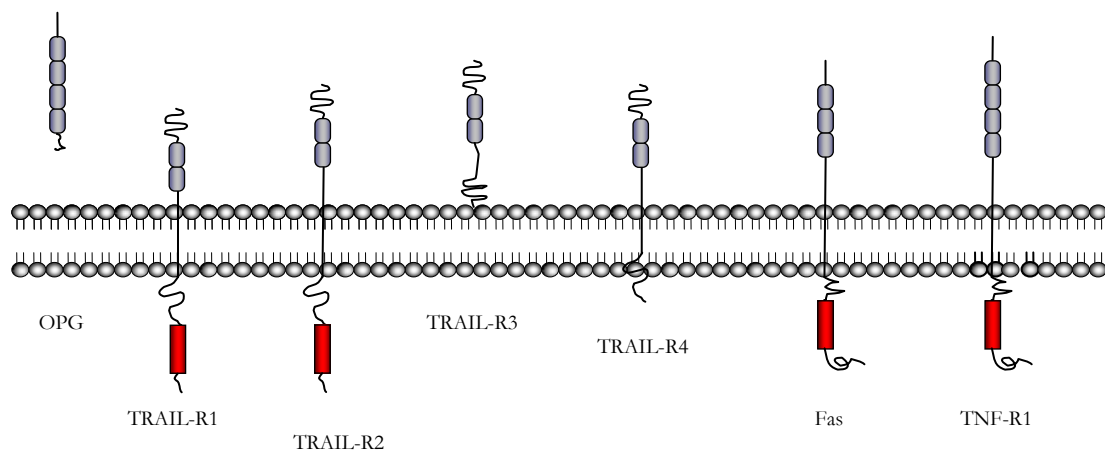


Abbildung 6: Auswahl einiger Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie.

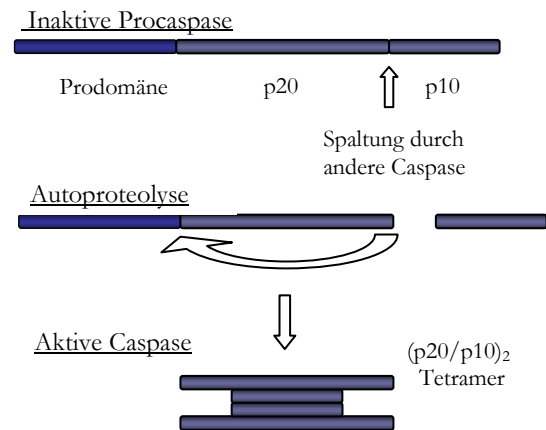
Blaue Ellipsen stellen die Cystein-reichen extrazellulären Subdomänen der Rezeptoren dar, die Todesdomäne wird als rotes Rechteck gezeigt. Einige Rezeptoren wurden von mehreren Forschungsgruppen identifiziert und tragen deshalb mehrere Namen. Abkürzung: OPG- Osteoprotegrin

2.5.6 Gemeinsame Endstrecke – die Caspasen-Kaskade

Die 14 vom menschlichen Genom codierten Caspasen sind nicht nur als Vollstrecker der Apoptose wirksam. Einige sind z.B. in die Prozessierung von Zytokinen oder in Differenzierungsvorgänge involviert, sodass die Caspasenaktivierung nicht mit dem Eintritt des PCD gleichzusetzen ist (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001). Caspasen (*cysteiny*l *aspartate-specific proteinases*) liegen in der Zelle zunächst in Form inaktiver Procaspasen, die aus einer Prodomäne und zwei Untereinheiten bestehen, vor. Die Aktivierung bedarf zweier Schritte, die in Abbildung 7 zur Darstellung kommen.

Abbildung 7: **Caspasenaktivierung**

Die Aktivierung der Caspasen geschieht in zwei Schritten: zunächst erfolgt die Trennung zwischen den beiden Untereinheiten, anschließend die Entfernung der Prodomäne durch Autokatalyse.



Die Aktivierung kann sowohl durch Proteolyse als auch durch Interaktion mit allosterischen Aktivatoren erfolgen. Zu diesen zählen z.B. das PIDDosom, DISC (KRAMMER, 2000) und das Apoptosom (JIANG, 2004). Der Polyproteinkomplex PIDDosom überführt Procaspase 2 nach DNA-Schäden in Caspase 2 (TINEL, 2004).

Mit der Aktivierung der Caspasen-Kaskade wird eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht. Die am Ende der Kaskade stehenden Effektorcaspasen spalten Kernmatrix, Zellgerüst und aktivieren Endonukleasen. Substrate sind auch Mitglieder der Bcl-2-Familie, die durch Caspasen eine proteolytische Reifung erfahren (KROEMER, 2000; FERRI, 2001).

2.5.7 Bcl-2-Proteinfamilie

Bcl-Proteine (*B-cell-lymphoma/B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene 2*) sind wichtige Apoptoseregulatoren (REED, 1997). Entsprechend ihrer Homologien innerhalb den BH-Domänen (BH = Bcl-2-Homologie) werden sie in 3 Gruppen unterteilt, die in Tabelle 4 gezeigt sind (ANTONSSON & MARTINOU, 2000):

	Wirkung	Sequenzhomologien in	Mitglieder	Literatur
1	antiapoptotisch	BH1, BH2, BH3, BH4	Bcl-2, Bcl _{XL}	CORY & ADAMS, 2002
2	proapoptotisch	BH1, BH2, BH3.	Bax, Bak	SAX, 2002
3		BH3	Bid, Bim, Bik, Noxa, Puma	DEGLI-EPOSTI, 2003

Tabelle 4: **Die Bcl-2-Proteinfamilie.**

Die antiapoptotischen Familienmitglieder unterdrücken die Apoptose-induzierte Bildung von ROS, Veränderungen der Ca⁺⁺-Homöostase, den Verlust des mitochondrialen

Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c. Die proapoptotischen Familienmitglieder wirken diesem entgegen. Aus Strukturuntersuchungen ist bekannt, dass einige Familienmitglieder, ähnlich bakteriellen Toxinen, in der Lage sind, Poren zu bilden. Möglicherweise können sie auf diese Weise die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran regulieren. Erwähnenswert ist auch die besondere Bedeutung der Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2, die in vielen Modellen mit einem Überlebensvorteil durch Verhinderung der Apoptose einhergeht (HOTCHKISS, 1999 c; MCCULLOUGH, 2001; COOPERSMITH, 2002).

2.5.8 Bedeutung der Apoptose in Sepsis, MODS und MOV

Noch ist nicht vollständig geklärt, ob dysregulierte Apoptose direkte Ursache des MODS ist oder ein Epiphänomen der Organdysfunktion darstellt. Als gesichert gilt jedoch, dass der PCD und der damit einhergehende Verlust funktionellen Gewebes maßgeblich zur schlechten Gesamtsituation der betroffenen Patienten beiträgt (WICHTERMAN, 1980; AYALA, 1998; HOTCHKISS, 1999a; CHUNG, 2001a+b; 2003;). Im Rahmen der Sepsis sind verschiedene Zellarten, die in Tabelle 5 dargestellt sind, von Apoptose betroffen.

Betroffene Zellpopulation	Konsequenz	Literatur
Lymphozyten	Beeinträchtigung der Immunfunktion bis hin zur Immunparalyse	HOTCHKISS, 1999a WEBER, 2004 LE TULZO, 2002
Hepatozyten	Einschränkung der Exkretions-, Syntheseleistung	COBB, 2000 DOUGHTY, 2002
Darmepithelien	Begünstigung der Translokation	HOTCHKISS, 2001a HIRAMATSU, 1997 COOPERSMITH, 2002 RUEMMELE, 2002
Lungenepithelien	Alveolarkollaps durch Surfactantmangel, Hypoxie	HIRAMATSU, 1997, MATUTE-BELLO, 2001

Tabelle 5: Zellpopulationen, die im Rahmen einer Sepsis von Apoptose betroffen sind und Konsequenzen des Zellverlustes.

Eine Sonderstellung nehmen neutrophile Granulozyten ein. Sie unterliegen im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen einer reduzierten Apoptoserate, die mit dem Schweregrad der Sepsis korreliert (MATUTE-BELLO, 1997; FETEROWSKI, 2001; TANEJA, 2004). Die prolongierte Überlebenszeit beruht auf den Wirkungen inflammatorischer Mediatoren humanen und mikrobiellen Ursprungs (SAVILL, 1997) sowie gesteigerter Transkription NFκB-abhängiger anti-apoptotischer Eiweiße (KUPFNER, 2001). Die gesteigerte Neutrophilenaktivierung ist mit einer augmentierten *respiratory-burst*-Aktivität

vergesellschaftet, sodass reaktive Sauerstoffspezies schwere Gewebsschäden in Leber (HO, 1996), Niere (HEINZELMANN, 1999), Lunge (SERRAO, 2001) und Darm (KUBES, 1992) mit verursachen. Abbildung 8 zeigt am Beispiel der Lymphozytenapoptose Auslöser und Konsequenzen des Untergangs dieser Zellpopulation.

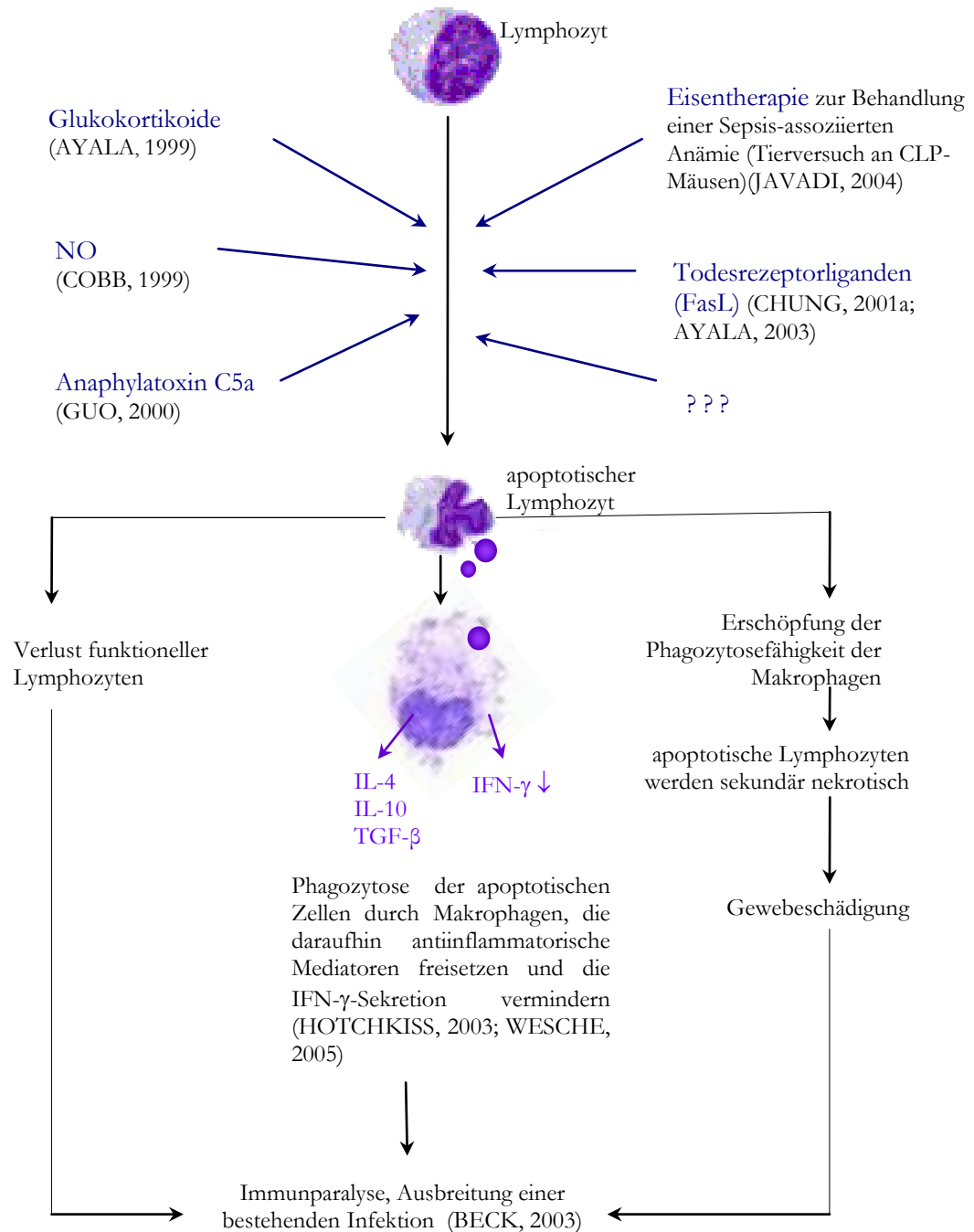


Abbildung 8: Übersicht über Auslöser und Folgen der Lymphozytenapoptose.

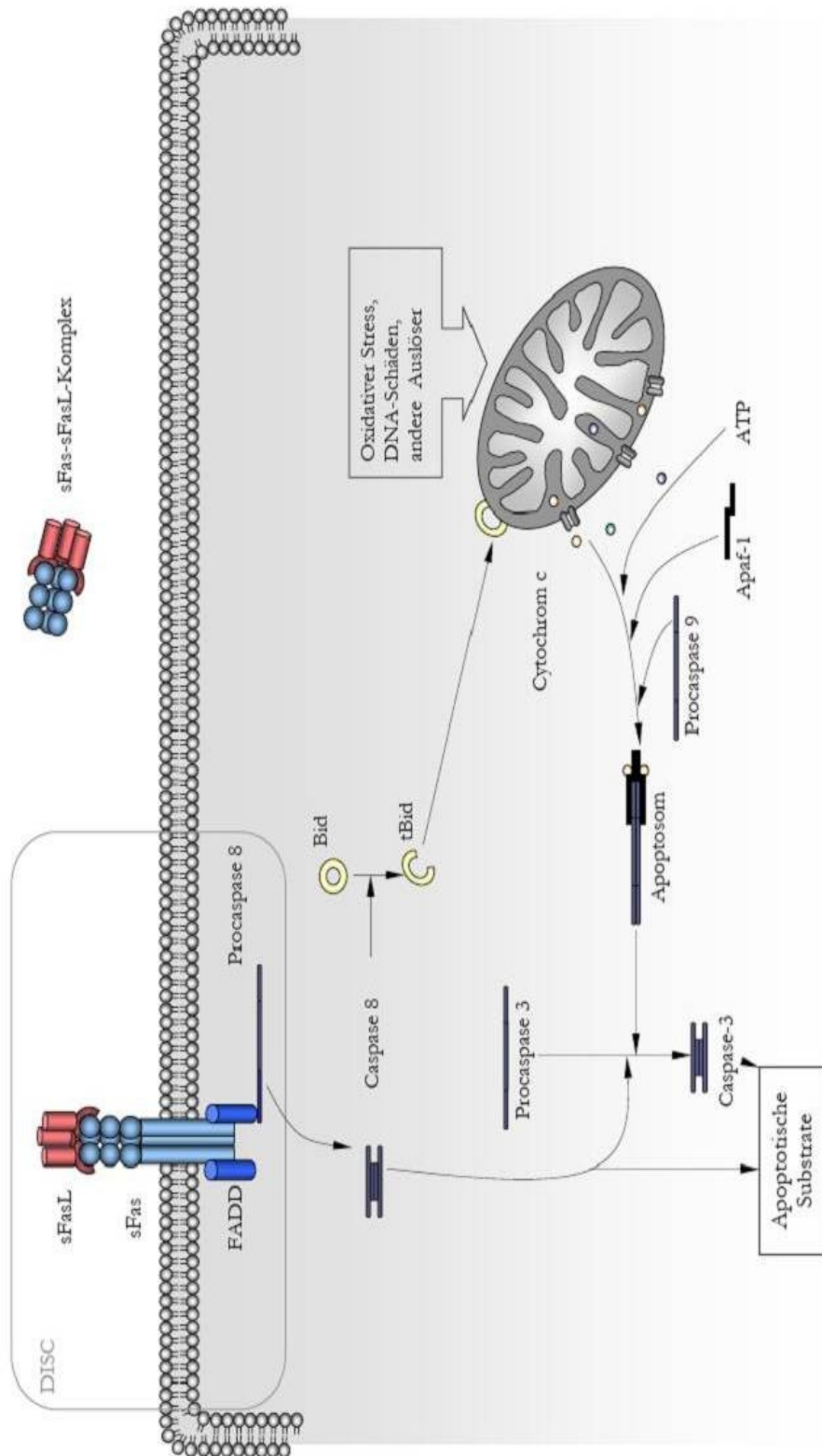


Abbildung 9: **Extrinsische und intrinsische/mitochondriale Apoptosesignalkaskade** (vereinfachte Darstellung) links oben: Bildung des DISC als Startpunkt des extrinsischen Apoptosepfades; rechts oben: Neutralisierung des proapoptotisch wirksamen sFasL; rechts unten: Mitochondrium als Startpunkt des intrinsischen Apoptosepfades, links unten: Zusammenlaufen beider Wege

2.6 Bedeutung der Apoptosemarker

2.6.1 Fas/mFas/sFas

Fas ist ein Zelloberflächenrezeptor, der nach Bindung seines Liganden, Fas Ligand, Apoptosesignale transduziert (NAGATA, 1994, 1995). Die Synthese des 48 kDa schweren Glykoproteins erfolgt an den Ribosomen des rauen ER (KRAMMER, 2000a). In sekretorische Vesikel verpackt, kann es als Antwort auf bestimmte Stimuli binnen kurzer Zeit zur Zelloberfläche transportiert werden (BENNETT, 1998). Fas wird dort zunächst als Monomer verankert. Erst durch Bindung von FasL kommt es zur Trimerisierung, d.h. zur Verbindung drei monomerer Fas-Moleküle zu einem Rezeptorkomplex. Die intrazellulären Domänen bilden dabei eine Todesdomäne aus, an die weitere Adaptermoleküle andocken.

Die Expression von Fas auf der Oberfläche macht Zellen in Abhängigkeit von weiteren Faktoren empfänglich gegenüber FasL-induzierter Apoptose. Der Rezeptor wird in besonders hohem Maße auf Lymphozyten und auf malignen Lymphomzellen exprimiert, in geringerer Ausprägung auch auf Zellen von Leber, Herz, Nieren, Ovarien, auf intestinale und vaskuläre Endothel (WATANABE-FUKUNAGA, 1992; NAGATA, 1997; KRAMMER, 1999). Auch Virus-infizierte Zellen zeigen hohe Fas-Expression. Dies dient ihrer Eliminierung zum Schutz benachbarter Zellen.

sFas stellt die lösliche (*soluble*) Form von Fas dar und geht durch alternatives Spleißen aus der mRNA für Fas hervor. Es entstehen Proteine, die Deletionen in der Membrandurchspannenden Domäne aufweisen (CHENG *et al.*, 1994). Bislang wurden 5 verschiedene mRNAs beschrieben. Die zugehörigen Proteine waren in der Lage, FasL-induzierte Apoptose durch Komplexierung von FasL zu verhindern (CHENG *et al.*, 1994)

2.6.2 FasLigand (FasL, Apo1L), mFasL, sFasL

Der physiologische Agonist von Fas, FasL, wird ebenfalls in Form eines trimeren Rezeptorkomplexes exprimiert. Aktivierte T-Lymphozyten sind durch Präsentation von FasL auf ihrer Oberfläche in der Lage, Fas-Rezeptor-präsentierende Zellen zu eliminieren. Dies stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulierung des Immunsystems dar (KRAMMER 2000, ROTH, 2004a).

Der FasL-Serumspiegel kritisch Kranker gilt als prediktiver Marker der Mortalität (PAPATHANASSOGLU, 2001). Die Membran-gebundene Form (mFasL) ist hauptsächlich auf aktivierten T-Lymphozyten, Dünndarm- und Lungenzellen nachweisbar. Dort werden durch Matrix-Metalloproteinasen 28 kDa grosse Bruchstücke (sFasL) aus dem

Molekül freigesetzt (KAYAGAKI, 1995; POWELL, 1999). Dieser Prozess wird als **shedding** bezeichnet. Matrix-Metalloproteinasen können durch virale Infektion aktiviert werden und somit zur gesteigerten Bildung von sFasL beitragen (IWAI, 1994). Dem entsprechend sind erhöhte sFasL-Werte unter anderem mit viraler Infektion assoziiert (DOUGHTY, 2002). sFasL wirkt in Dosen, die keine Apoptose auslösen, chemotaktisch auf Neutrophile und ist somit als proinflammatorischer Mediator einzustufen (OTTONELLO, 1999). In höheren Konzentrationen verstärkt sFasL, insbesondere im Rahmen der Inflammation, proapoptotische Prozesse (OSHIMI, 1996).

2.6.3 TRAIL (Apo2L)

TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ist ein 281-Aminosäuren-umfassendes Transmembranprotein, das unter anderem auf Zellen von Lunge, Leber, Herz, Niere und Immunzellen exprimiert wird (SMYTH, 2003). Die lösliche Form entsteht nach intrazellulärer Prozessierung des Moleküls durch Proteasen. Verpackt und gespeichert in sekretorischen Vesikeln werden sie nach Freisetzung im Serum messbar (LIABAKK, 2002). Signifikante TRAIL-Mengen werden als Antwort auf einen IFN- α -Reiz aus zirkulierenden Monozyten und Neutrophilen freigesetzt (KAPLAN, 2000; TECCIO, 2004). Sowohl membrangebundenes, als auch lösliches TRAIL, sind in der Lage, den programmierten Zelltod in humanen Tumorzelllinien und anderen sensiblen Zellen auszulösen (BAETU, 2002; TECCIO, 2004). Bislang sind 5 Rezeptoren bekannt, von denen nur TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Apoptosesignale transduzieren. Zwei weitere zellgebundene (TRAIL-R3, TRAIL-R4), sowie ein löslicher Rezeptor, der als Osteoprotegrin (OPG) bezeichnet wird, wurden beschrieben. Letztere werden auch als Scheinrezeptoren (DcR für *decoy receptor*) bezeichnet (Tabelle 6).

Rezeptor	Synonyme	Funktion	Literatur
TRAIL-R1	DR4	-Apoptose	PAN, 1997a
TRAIL-R2	DR5 Killer	-Apoptose	PAN, 1997b; WU, 1997
TRAIL-R3	TRID DcR1	-Scheinrezeptor	DEGLI-ESPOSTI, 1997; PAN, 1997b;
TRAIL-R4	DcR2 TRUND	-Scheinrezeptor -Regulator von TRAIL-R2	DEGLI-ESPOSTI, 1997; PAN, 1998, CLANCY, 2005
OPG		-Scheinrezeptor -Arteriosklerose ? -sichert das Überleben von Tumorzellen	EMERY, 1998; NEVILLE-WEBBE, 2004

Tabelle 6: **TRAIL-Rezeptoren und ihre Wirkungsweise.**

Über die Bedeutung von TRAIL im Rahmen der Sepsis existiert bislang wenig Literatur. Bekannt sind immunregulatorische Eigenschaften des Moleküls, wie die Auslese seneszenten Zellen des Granulozytenpools oder Begrenzung der lymphozytären Expansion (LUM, 2005; JANSSEN, 2005).

2.6.4 Cytochrom c

Bereits im Kapitel 2.5.4.1 wurde auf einige wichtige Funktionen des Cytochrom im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung und der Apoptose eingegangen. Untersuchungen der Cytochrom c-Serumspiegel durch ADACHI ergaben eine Zunahme der Konzentration mit graduellen Anstieg in Abhängigkeit vom Schweregrad einer Sepsis. Auch Patienten mit SIRS zeigten erhöhte Werte. Mithilfe des Serumspiegels scheint laut Ergebnissen der Studie darüber hinaus eine prognostische Aussage bezüglich des Überlebens möglich. Ebenfalls korreliert Cytochrom c mit der Schwere des MODS, quantifizierbar anhand der Organdysfunktionsscores APACHE II und MOF-Score (ADACHI *et al.*, 2004). BEN-ARI zeigte eine Korrelation des Cytochrom-c-Spiegels mit einigen Lebererkrankungen und dem Apoptoseindex von Hepatozyten (BEN-ARI, 2003).

2.6.5 M30 (Ck18Asp396)

Nach Aktivierung der Caspasen-Kaskade kommt es zum enzymatischen Abbau der DNA und des Zellgerüsts. Ein Gerüstbaustein epithelialer Zellen ist das Cytokeratin 18, das im Zuge der Apoptose am Aspartatsäurerest 396 durch die Caspasen 3, 7 und 9 gespalten wird (LEERS, 1999). Das dabei entstehende Ck18Asp396 wird als M30 bezeichnet, ein Neo-Epitop, das in einer frühen Phase der Apoptose, zeitlich noch vor der DNA-Fragmentation, an der Zelloberfläche präsentiert wird.

M30 ist weder auf überlebensfähigen geschädigten, noch auf nekrotischen Zellen nachweisbar. Damit zeichnet sich das Neoepitop als ein hochspezifischer Marker für Apoptose epithelialer Zellen aus. Darüber hinaus korreliert seine Ausprägung mit dem TUNEL-Apoptoseindex (LEERS, 1999; CHIU, 2001).

Signifikant erhöhte Serumspiegel von M30 lassen sich bei Septikern nachweisen. Auch Trauma-Patienten zeigen im Vergleich zu Gesunden hohe M30-Werte, die mit der Mortalität dieser Gruppe korrelieren (ROTH, 2004a). Die Apoptose gastrointestinaler Epithelien wird hierbei als ein tragender Pathomechanismus angesehen (HOTCHKISS, 1999a; 2000). In einem murinen Ischämie-Reperusionsmodell ließ sich M30 auch auf Hepatozyten nachweisen (PAXIAN *et al.*, 2003).

3. Ziele der Arbeit/Fragestellung

Die Bedeutung der veränderten Apoptose in der Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens nimmt einen zunehmenden Stellenwert auf dem Gebiet der Intensivmedizin ein. Genaue Kenntnisse über die molekularen Zusammenhänge und die Relevanz des Zelltodes unter diesen Bedingungen, bilden unabdingbare Voraussetzung zur Entwicklung effektiver Therapieoptionen.

Während der Beitrag der Apoptose zur dysregulierten Immunantwort bei Schock und Sepsis als gesichert gilt (MARSIK, 2003), wird ihre Bedeutung im Rahmen des Organversagens bislang kontrovers beurteilt (OBERHOLZER, 2001; DE FREITAS, 2004). Die Prognose des Patienten mit etabliertem MOV ist trotz prinzipiell beherrschbarer Einzelorganversagen noch immer schlecht und erfordert bei mehrtägigem Organersatz erhebliche finanzielle und personelle Ressourcen. Die Möglichkeit, anhand einfach zu bestimmender Blutparameter, die Tragweite Sepsis-induzierter Apoptose und die Prognose kritisch Kranker hinsichtlich Überleben und Organfunktion abzuschätzen, könnte bei wenig invasiver, zeitnaher Diagnostik durch die Möglichkeit frühzeitig spezifische Therapiemaßnahmen einzuleiten, das *Outcome* verbessern und Grundlage für neue Therapieansätze sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sTRAIL, sFas, sFasL, die über den Rezeptor-vermittelten Weg in die Apoptose eingreifen, sowie Cytochrom c, als Ausdruck mitochondrialer und M30 als früher Marker bereits abgelaufener Apoptose im Serum von Septikern, SIRS-Patienten und Gesunden bestimmt.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Prüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Höhe des Serumspiegels der genannten Apoptosemarker sowie der Schwere des MODS/MOV quantifiziert anhand des *Sepsis Related Organ Failure Assessment Scores* (SOFA). Ebenfalls überprüft wurde eine mögliche Beziehung der Serumspiegel mit dem Schweregrad der Einschränkungen einzelner Organsysteme, verifiziert anhand der SOFA-*Subscores* für Kreislaufsystem, Atmungssystem, Nierenfunktion, Gerinnungssystem, Leberfunktion und zerebrale Funktion (GLASGOW-*Coma-Scale*).

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob ein Marker geeignet ist, prognostische Aussagen bezüglich des Überlebens der Patienten zu treffen.

4. Material und Methoden

4.1 Planung und Durchführung der Studie

4.1.1 Studiendesign

Die Studie wurde als prospektive Beobachtungsstudie an Patienten der operativen Intensivstation der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena durchgeführt.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der FSU Jena in Übereinstimmung mit den ethischen Standards der in der Deklaration von Helsinki festgelegten Prinzipien genehmigt. Bei Patienten, die aufgrund ihres Krankheitszustandes nicht zur Einwilligung fähig waren, wurde die mutmaßliche Zustimmung durch den nächsten Angehörigen geprüft.

4.1.2 Studienbeteiligte

Ab Januar 2001 wurden initiiert durch Professor Dr. med. K. Reinhart und Professor Dr. med. F.M. Brunkhorst an der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der FSU Jena Patientendaten zur Durchführung mehrerer Studien erhoben. Dies erfolgte durch zwei Doktoranten und die Studienschwester, B. Korda. Anschließend wurden die auf Papier erhobenen Daten in eine Datenbank von Microsoft® Access 2000 (Microsoft, Seattle, USA) übertragen. Diese wurde in Kooperation mit Dipl. Ing. F. Reißner (EDV Abteilung der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der FSU Jena) erstellt. Die serielle Bestimmung der Laborparameter, wie Bilirubin und Kreatinin erfolgte im Institut für Klinische Chemie. Professor Dr. med. M. Bauer initiierte 2003 unter Mitarbeit von Fr. Dr. med. G. Paxian eine Studie zur Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der Sepsis. Die hierzu erforderliche Bestimmung von TRAIL, sFas, FasL, M30 und Cytochrom c erfolgte im Institut für experimentelle Anästhesie des Universitätsklinikums Jena unter Mitarbeit von Frau Dr. med. G. Paxian, MTA E. Walther und Doktorandin S. Köhler. Die statistischen Berechnungen wurden durch PD Dr. med. M. Paxian mit SigmaStat V. 1.0 für Windows durchgeführt.

4.1.3 Datenerhebung

Ein Patiententag umfasste die Zeit von 6:00 Uhr bis 6:00 Uhr des darauf folgenden Tages. An diesem Folgetag wurden, mit Hilfe des von den Intensivstationen verwendeten elektronischen Krankenaktensystem COPRA die Patientenparameter der zurückliegenden

24 Stunden analysiert. Dabei wurden die Minima / Maxima der Laborwerte und der physiologischen Parameter jedes Studienpatienten dokumentiert und der SOFA-Score berechnet. Da die meisten Patienten am ersten Beobachtungstag nicht um 6:00 Uhr auf die Intensivstation aufgenommen wurden, ist hier der Zeitraum zwischen Aufnahme auf die Intensivstation und 6:00 Uhr des Folgetages analysiert worden.

Die Blutprobenentnahme erfolgte täglich um 6:15 Uhr im Rahmen der Routineblutentnahme mit einer Sarstedt® Serum-Monovette und wurde von dem Pflegepersonal der ITS durchgeführt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben von Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie bearbeitet. Die Monovetten wurden bei 1000 g 20 min bei 4°C zentrifugiert, anschließend das Serum aliquotiert und die einzelnen Proben bei –80°C eingefroren (Eppendorf® *Tubes*). Die Bestimmung der Parameter mittels ELISA wurde im Institut für experimentelle Anästhesie des Universitätsklinikums Jena durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Aliquot des Patienten 1h vor Messung aufgetaut. Von 3 Patienten mit fulminantem Leberversagen wurden durch entsprechend ausgebildete Ärzte Leberbiopate entnommen. Die Bearbeitung der Gewebeproben zu histologischen Präparaten erfolgte im Institut für experimentelle Anästhesie Jena.

4.1.4 Datenbank-Microsoft® Access 2000

Das erstellte Programm war in der Lage, eingegebene Werte auf Formatfehler oder unplausible Werte, die außerhalb zuvor definierter Grenzen lagen, zu überprüfen.

Eingabefehler wie Temperatur „3,95 °C“ statt „39,5 °C“ wurden erkannt; wohingegen Falscheingaben wie Leukozyten „2,5 Gpt/l“ statt „25 Gpt/l“ nicht aufgedeckt werden konnten, da beide Angaben möglich sind. Fehler, die bei der Eingabe nicht erkannt wurden, wurden bei einer weiteren manuellen Überprüfung der Datenbank korrigiert. Vor Auswertung der Ergebnisse wurden die Daten zusätzlich auf ihre Konsistenz geprüft. Dabei wurde zum Beispiel kontrolliert ob die Angaben bei der ACCP/SCCM-Klassifikationseinteilung mit den Angaben des Verlaufsbogens übereinstimmen und ob die Klassifizierung richtig vorgenommen wurde.

4.1.5 Patienteneinschlusskriterien

Alle Patienten, die innerhalb des Studienzeitraumes auf der operativen Intensivstation aufgenommen wurden und zusätzlich die folgend genannten Kriterien erfüllten, wurden in die Studie eingeschlossen:

- voraussichtliche Liegedauer > 48 h
- Vorliegen der Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie
- Alter > 18 Jahre
- Ausschluss einer Schwangerschaft

Betrug die Verweildauer des Patienten auf Intensivstation entgegen der Erwartung < 48 Stunden, wurde dieser nachträglich aus der Studie ausgeschlossen.

Anhand des klinischen Bildes sowie der erhobenen klinischen Daten und Blutwerte wurden die Patienten anschließend in die Untergruppen Leberversagen, Septiker und SIRS-Patienten aufgeteilt. Folgende Voraussetzungen mussten für die Aufnahme in die entsprechende Untergruppe erfüllt sein:

4.1.6 Definitionen SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock

Die in dieser Studie verwendeten Begriffe zur Beschreibung der Schweregrade inflammatorischer Reaktionen entsprechen den Definitionen, die 1991 in der Konsensus-Konferenz des *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* und der *European Society of Intensive Care Medicine* (BONE, 1992) empfohlen wurden. Die formalen Definitionen der einzelnen Krankheitsbilder sind in Tabelle 1 auf Seite 7 dieser Arbeit aufgeführt.

4.1.6.1 SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SIRS beschreibt eine generalisierte, entzündliche Abwehrreaktion unterschiedlicher, nicht-infektiöser, Ätiologie.

Kausal führen Krankheitsbilder wie Polytrauma, operative Eingriffe unter Verwendung einer Herz-Lungenmaschine oder Autoimmunerkrankungen zum klinischen Bild des SIRS. Die extrakorporale Zirkulation ist als klassisches SIRS-Modell anerkannt (BAUER *et al.*, 2005). Ein Großteil der SIRS-Patienten dieser Studie wurde im Vorfeld aufgrund einer Herzoperation einem solchen Verfahren unterzogen.

4.1.6.2 Sepsis

Liegt einer generalisierten Entzündungsreaktion (SIRS) eine infektiöse Genese zugrunde, spricht man *per definitionem* von einer Sepsis. Die Infektion kann dabei klinisch gesichert sein oder als wahrscheinlich angenommen werden (beispielsweise nach operativen oder invasiven Maßnahmen). Ein mikrobiologischer Nachweis gilt nicht als Voraussetzung.

4.1.6.3 Schwere Sepsis

Bei Patienten mit Sepsis und gleichzeitigem Vorliegen mindestens einer infektionsbezogenen Organdysfunktion wird von schwerer Sepsis gesprochen. Die Organdysfunktion ist definiert als: Bewusstseinsveränderung, arterielle Hypotonie (< 90 mmHg u./o. Katecholamingabe), Thrombozytopenie ($< 100\,000/\mu\text{l}$), arterielle Hypoxämie ($p_a\text{O}_2/\text{FiO}_2 < 250$), renale Dysfunktion (Oligurie mindestens 2 Stunden) oder eine ungeklärte metabolische Azidose ($\text{BE} < 5$ mmol/l oder pathologische Laktatkonzentration).

4.1.6.4 Septischer Schock

Weist ein septischer Patient trotz adäquater Volumensubstitution ohne Vorhandensein von anderen Gründen für eine Hypotonie weiterhin ein Kreislaufversagen auf, wird dieses als septischer Schock bezeichnet. Definitionsgemäß ist der systolische Blutdruck unter 90 mmHg oder zeigt einen Abfall von über 40 mmHg vom Ausgangswert. Weiteres Kriterium war ein Katecholaminbedarf $> 0,1 \mu\text{g/kg/min}$ über mindestens eine Stunde pro Tag.

4.1.6.5 Leberversagen

Die Patienten wurden dann in die Leberversagensgruppe aufgenommen, wenn Exkretions- und Syntheseleistung deutlich beeinträchtigt waren. Das heißt der Bilirubinspiegel $34,0 \mu\text{mol/l}$ erreichte, beziehungsweise überschritt und die Thromboplastinzeit (Quick) 50% erreichte, beziehungsweise unter 50% abfiel. Unter diesen klinischen Bedingungen und Berücksichtigung der Gesamtsituation wurde die Indikation zu einem extrakorporalen Detoxifikationsverfahren, der sogenannten MARS (*Molecular Adsorbent Recirculating System*) Dialysebehandlung gestellt.

Bei diesem Leberunterstützungsverfahren handelt es sich um eine Kombination aus Methoden der Hämodiafiltration, Adsorption und Hämodialyse. Ziel ist die Entfernung toxischer Substanzen, welche im Leberversagen kumulieren. Unter anderem werden so die Blutspiegel von Bilirubin, Gallensäuren, Harnstoff, Ammoniak und sogar Zytokinen (Interleukin 6 und $\text{TNF-}\alpha$) gesenkt (MITZNER, 2000). Für den Patienten kann dies eine Besserung von Dysfunktionen des Gehirns, der Niere, des Kreislaufs und der Leber bedeuten (MITZNER, 2000; BEN ABRAHAM, 2001; SCHMIDT, 2001).

4.1.7 Stärke der Patientenkollektive

Von den in die Datenbank aufgenommenen Patienten konnten schließlich 51 Septiker von denen 22 verstarben (43,1%) und 41 SIRS-Patienten von denen 7 verstarben (17,1%) zur

Auswertung herangezogen werden. Das durchschnittliche Alter der von Sepsis betroffenen Patienten betrug 62 das der SIRS-Patienten 68 Jahre (siehe Tabelle 7). Nach Diagnosestellung überlebten verstorbene Septiker im Mittel 20 Tage, Patienten der SIRS-Gruppe 9 Tage. Außerdem wurden 10 gesunde Probanden im Alter von 20-26 Jahren, 5 männlichen, 5 weiblichen Geschlechts als Vergleichsgruppe herangezogen.

	Geschlecht	Anzahl	davon verstorben		Alter	
			absolut	in %	Mittelwert \pm Standardabweichung	Median
Sepsis	männlich	31	13	41,9	61 \pm 13,3	63
	weiblich	20	9	45,0	65 \pm 14,3	65
	gesamt	51	22	43,1	63 \pm 13,6	64
SIRS	männlich	31	3	9,6	65 \pm 8,3	67
	weiblich	10	4	40,0	73 \pm 7,0	78
	gesamt	41	7	17,1	67 \pm 8,7	68

Tabelle 7: **Epidemiologische Daten des Studienkollektives.**

4.1.8 Beurteilung der Patienten mit **Score**-Systemen

4.1.8.1 SOFA-Score (*Sepsis Related Organ Failure Assessment*)

Zur Einschätzung der Schwere der Organdysfunktion wurden die Patienten nach dem 1994 entwickelten **SOFA-Score** der *European Society of Intensive Care Medicine*, der sich aus 6 **Subscores** zusammensetzt, evaluiert. Die **Subscores** bewerten Atmung, Gerinnungssystem, kardiovaskuläres System, Leberfunktion, ZNS-Funktion (**GLASGOW-Coma-Scale**) und Nierenfunktion. Dabei können jeweils Punktwerte von 0 für keine Einschränkung bis 4 für höchste Einschränkung erzielt werden.

Der Gesamt-SOFA-Punktwert ergibt sich aus Addition der erzielten SOFA-**Subscore**-Punkte und kann maximal 24 betragen (siehe Tabelle 8). Jeweils der schlechteste Zustand eines Tages wird mit Punkten bewertet.

Problematisch ist die Beurteilung der ZNS-Funktion mittels **GLASGOW-Coma-Scale**, da die Mehrzahl intensivmedizinisch betreuter Patienten medikamentös sediert ist. Um realistische Werte für dieses Item zu erhalten, wurde deshalb der neurologische Status so bewertet, wie er vor Sedierung war oder abgeschätzt, wie er ohne Sedativa gewesen wäre (VINCENT *et al.*, 1996).

Zunächst nicht als prognostischer Marker entwickelt, konnte VINCENT *et al.* 1998 eine positive Korrelation zwischen Höhe des SOFA-Wertes und Mortalität des Patienten

nachweisen. Der SOFA-Score ist damit ein geeignetes Instrument zur Objektivierung der Organfunktion kritisch kranker Patienten.

Organdysfunktion	SOFA-Score			
	1	2	3	4
Respiratorische Insuffizienz - p_aO_2/F_iO_2 [mmHg]*	<400	<300	<200	<100
Störungen der Hämostase -Thrombozyten [$\cdot 10^3/\mu l$]	<150	<100	<50	<20
Leberdysfunktion -Bilirubin [mg/dl] [$\mu mol/l$]	1,2 – 1,9 20 - 32	2,0 - 5,9 33 - 101	6,0 – 11,9 102 - 204	>12 >204
Kreislaufinsuffizienz** -Hypotension[mmHg]	MAP<70	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamin (jede Dosis)	Dopamin >5 oder Adrenalin $\leq 0,1$ oder Noradrenalin $\leq 0,1$	Dopamin >15 oder Adrenalin >0,1 oder Noradrenalin >0,1
Störung des ZNS -Glasgow Coma Scale ***	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Niereninsuffizienz -Serumkreatinin [mg/dl] [$\mu mol/l$] -Urinproduktion [ml/d]	1,2 – 1,9 100 - 170	2,0 – 3,4 171 - 299	3,5 – 4,9 300 - 440 <500	>5 >440 <200

Tabelle 8: SOFA-Score zur Abschätzung des Schweregrades der Organdysfunktion.

- * FiO_2 = Inspiratorische Sauerstoffkonzentration, p_aO_2 = arterieller Sauerstoff-Partialdruck
 ** Katecholamine [$\mu g/kg/min$] für mindestens 1 h
 *** unter sedierender Medikation wurde der GLASGOW-Coma-scale –Wert, der vor Sedation bestand, genommen oder abgeschätzt, wie er ohne Sedation wäre

4.1.8.2 GLASGOW-Coma-Scale (GCS)

Die GCS ist eine einfache Skala zur Abschätzung einer Bewusstseinstörung, die 1974 von TEASDALE und JENNETT in Glasgow entwickelt wurde.

Sie beinhaltet 3 Kategorien, für die jeweils Punkte vergeben werden. Aus Addition der Einzelwerte ergibt sich die Gesamtpunktzahl, die maximal 15 für keine Einschränkung des Bewusstseins und minimal 3 für schwerste Beeinträchtigung des Bewusstseins beträgt.

Die Punktverteilung und die Kategorien sind in Tabelle 9 dargestellt.

Punkte	Augen öffnen	verbale Kommunikation	motorische Reaktion
6	-	-	befolgt Aufforderungen
5	-	konversationsfähig, orientiert	gezielte Schmerzabwehr
4	spontan	konversationsfähig, desorientiert	ungezielte Schmerzabwehr
3	nach Aufforderung	unzusammenhängende Worte	auf Schmerzreiz, Beugeabwehr (abnormale Beugung)
2	auf Schmerzreiz	unverständliche Laute	auf Schmerzreiz, Strecksynergismen
1	keine Reaktion	keine verbale Reaktion	keine Reaktion auf Schmerzreiz

Tabelle 9: **GLASGOW - Coma - Scale.**

4.2 ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

4.2.1 Allgemeines Prinzip der ELISA-Testsysteme

Für die Bestimmung der Parameter (TRAIL, sFas, sFasL, M30, Cytochrom c) wurde ein hoch spezifisches, auf immunologischen Messprinzipien beruhendes Verfahren, der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), verwandt. Die Methode macht sich die Tatsache zunutze, dass Antikörper eine spezifische Bindung mit ihrem zugehörigen Antigen eingehen. Diese Bindung ist überaus stabil.

Es wurden kommerziell erhältliche ELISA-*Kits* der Firmen R&D Systems, PEVIVA AB, und CALBIOCHEM® genutzt. Die *Assays* für die verschiedenen Parameter unterscheiden sich nicht im Prinzip, jedoch etwas im ihrem Ablauf, weshalb später im Einzelnen auf die Besonderheiten der unterschiedlichen *Assays* eingegangen werden soll.

Allen gemein ist der Aufbau nach dem „*Sandwich*“-Prinzip (siehe Abbildung 10): Ein erster Antikörper, der sogenannte *coating*-Antikörper, liegt gebunden an die feste Phase (96-*well* Mikrotiterplatte) vor. Zugabe der Probe, die das nachzuweisende Antigen enthält, führt zu dessen Bindung an den fixierten *coating*-Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssiges Antigen und ungebundene Bestandteile durch mehrmaliges Waschen mit einem ELISA-*Washer* entfernt.

Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper, der Detektions-Antikörper, zugefügt. Dieser kann nun an ein anderes Epitop desselben Antigens binden. Es entsteht ein

Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der sogenannte **Sandwich**-Komplex. Der Detektions-Antikörper ist an seinem Fc-nahen Ende mit einem Enzym, meist HRP (englisch: *horseradish peroxidase*, deutsch: Meerrettichperoxidase) gekoppelt.

Durch erneutes Waschen wird ungebundener Antikörper entfernt und anschließend ein Farbsubstrat (z.B. Tetramethylbenzidin) zupipettiert. Das an den Detektions-Antikörper gebundene Enzym setzt dieses Substrat um. Das spiegelt sich in einem Farbumschlag wider. Im Falle von Tetramethylbenzidin wird das farblose Substrat in blaues verwandelt. Durch Zugabe einer Stopplösung (z.B. Schwefelsäure) erfolgt ein nochmaliger Farbumschlag nach gelb, der die chemische Reaktion beendet. Die Stärke der Farbreaktion, ist proportional dem Antigengehalt der untersuchten Probe.

Zur objektiven Bestimmung wird die Extinktion der Probe mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Anhand von, auf jeder Platte mitgeführten, Standards, deren Konzentration bekannt ist, erstellt die Software Extinktions-Konzentrations-Kurven. Aus der für die Probe erhaltenen Extinktion berechnet das Programm die zugehörige Konzentration.

Alle Waschschritte wurden mit einem programmierbaren ELISA-**Washer** (Modell Columbus, TECAN SLT-**Labinstruments**, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt. Wenn nötig, wurden die Mikrotiterplatten während der Inkubationszeiten auf einem Taumelgerät (WT17, Biometra®) gemischt.

Die Absorptionen wurden für alle **Assays** mit einem ELISA-**Reader** (Tecan Spectra Classic, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) unter Verwendung des zugehörigen Softwarepaketes gemessen und die Konzentrationen berechnet. Es bestand die Option kurz vor der Messung die Proben im Gerät zu rütteln.

Auf jeder Platte wurden mindestens 7 Standards in Doppelbestimmung zur Berechnung einer Standardkurve mitgeführt. Zur Sicherung der Qualität der Arbeitsschritte und Überwachung der Genauigkeit der Ergebnisse wurden zusätzlich zwei Kontrollen bekannter Konzentration, eine im niedrigen, eine im hohen Messbereich abwechselnd mitgeführt.

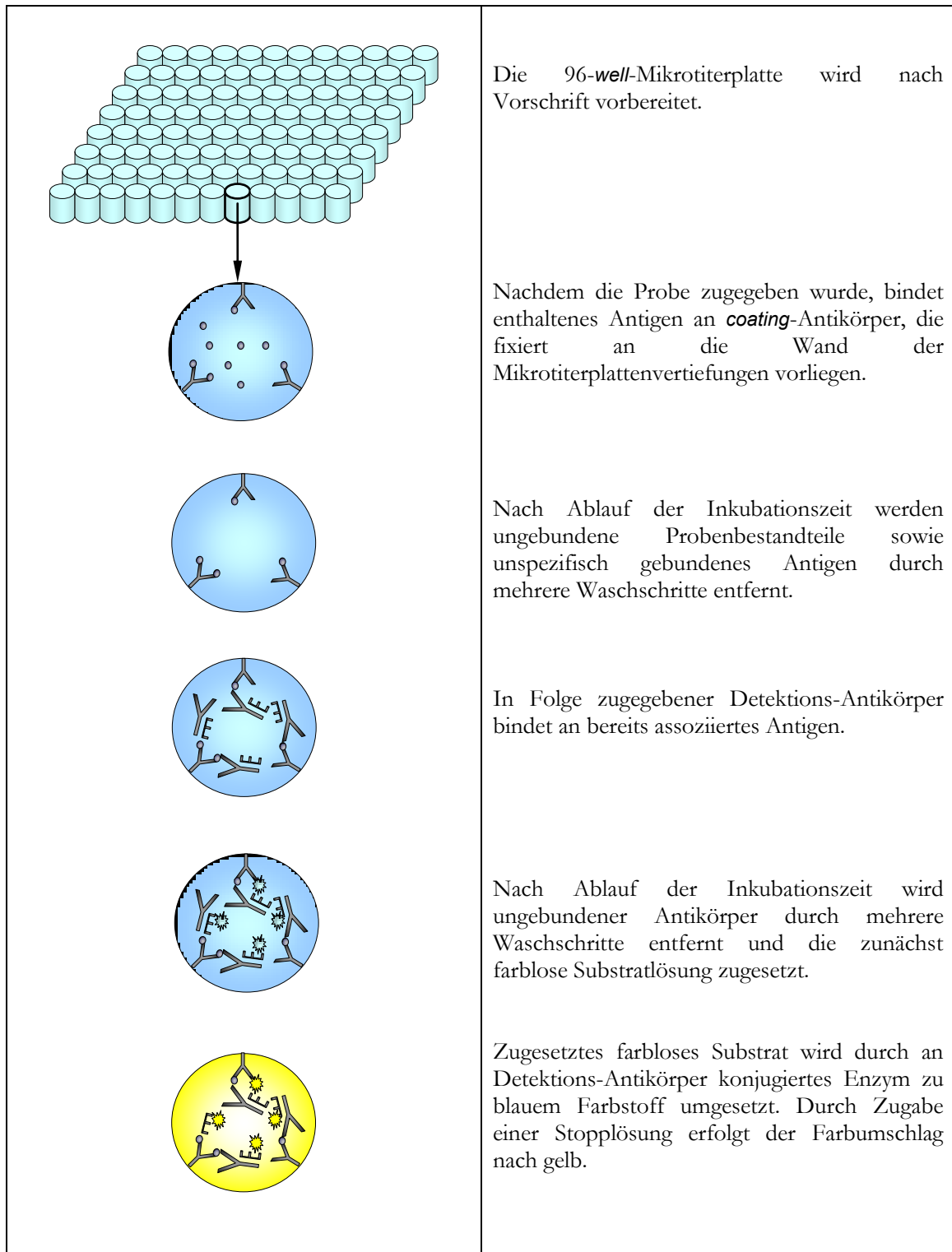


Abbildung 10: Veranschaulichung des „Sandwich-Prinzips“ der ELISA-Messsysteme.

Nur wenn das Antigen an den *coating*-Antikörper gebunden hat, kann auch der Detektions-Antikörper, der mit dem Enzym für die Farbreaktion gekoppelt ist, binden. Die beiden Antikörper koppeln an zwei verschiedene Epitope desselben Antigens. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Menge der gebundenen Antigene.

Die folgenden Abschnitte erklären die Besonderheiten der einzelnen **Assays**:

4.2.2 *human TRAIL*/TNFSF10 (Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis)

Die Wells der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl *Assay Diluent* RD1S befüllt. Nach Zugabe von je 50 µl Serumprobe, Standard oder Kontrolle inkubierte die Platte 2 h auf dem Taumelgerät.

Serum wurde durch 4 maliges Waschen mit je 400 µl Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden je 200 µl *TRAIL-Conjugate* in jedes *Well* pipettiert. Auch diese zweistündige Inkubation erfolgt auf dem Taumelgerät. Nach Wiederholung des Waschschrilles erfolgt die Zugabe der Substratlösung, die unmittelbar zuvor aus Reagenz A (Wasserstoffperoxid) und Reagenz B (Tetramethylbenzidin) zu gleichen Teilen hergestellt wird. Die Inkubation fand 30 min im Dunkeln statt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (2 N Schwefelsäure) beendet. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm und 540 nm Wellenlänge.

4.2.3 *human sFas Immunoassay* (Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis)

Proben gesunder Probanden wurden 1:10, die der Kranken 1:50 mit *Calibrator Diluent* RD5L verdünnt. Die *Wells* der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl *Assay Diluent* RD1-8 und 100 µl vorbereitetem Serum, Standard oder Kontrolle befüllt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Serum wurde durch 4maliges Waschen mit je 400 µl Waschpuffer entfernt.

Anschließend wurden je 200 µl *sFas-Conjugate* in jedes *Well* pipettiert. Es folgte eine 2stündige Inkubation mit Wiederholung des Waschschrilles. Die nun folgende Weiterbearbeitung beginnt mit Zugabe des hergestellten Substrates und entspricht dem *TRAIL-Immunoassay*. Proben, die nach der ersten Messung eine zu hohe Extinktion zeigten wurden 1:100 verdünnt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor.

4.2.4 *human sFas Ligand Immunoassay* (Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis)

Die *Wells* der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl *Assay Diluent* RD1S befüllt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Das Serum wurde durch 4maliges Waschen mit je 400 µl Waschpuffer entfernt.

Anschließend wurden je 200 µl *FasL-Conjugate* in jedes *Well* pipettiert. Es folgte eine 2stündige Inkubation mit Wiederholung des Waschschrilles. Die Weiterbearbeitung beginnt mit Zugabe des hergestellten Substrates und entspricht dem *TRAIL-Immunoassay*.

4.2.5 M30/CK18Asp396 Apoptosense™ ELISA (PEVIVA AB, Bromma, Schweden)

Zunächst werden 25 µl der Serumprobe oder des Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, anschließend 75 µl HRP-*Conjugate solution* zugefügt. Die Reaktion findet über 4 h auf dem Taumelgerät statt. Ungebundener Ak wird durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 250 µl Waschlösung durch einen ELISA-Washer entfernt. Anti-CK18Asp396 ist mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Das Enzym setzt nun das in der Substratlösung enthaltene Tetramethylbenzidin um. Diese Reaktion erfolgt innerhalb 20 min unter Lichtausschluss. Zugabe von 50 µl Stopplösung (0,1 M Schwefelsäure) limitiert die Reaktion. Bevor die Extinktion der Ansätze bei 450 nm und 540 nm im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen wird, wird die Platte für 5 Sekunden sanft im Gerät gerüttelt, um eine homogene Farbe zu gewährleisten.

4.2.6 Cytochrom c ELISA Kit (CALBIOCHEM®, Darmstadt)

Die *Wells* der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl *Calibrator Diluent* RDP5 befüllt. Anschließend jeweils 100 µl Standard oder Probe zupipettiert und die Mikrotiterplatte staubfrei bedeckt. Die Ansätze wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert um nachfolgend 4 mal mit Wasch-Puffer gespült zu werden. Danach wurden die Proben weitere 2 h bei Raumtemperatur mit je 200 µl Konjugat inkubiert. Es folgte eine Wiederholung des Waschschrilles und die Zugabe von 200 µl Substratlösung, die in Folge 30 min unter Lichtschutz in den *Wells* belassen wurde. Unmittelbar nach der Zugabe von 50 µl Stopplösung und sanftem Mischen der Mikrotiterplatte im Plattenlesegerät, wurden die Extinktionen bei 450 und 540 nm abgelesen.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Probengewinnung und –vorbereitung

Von drei Patienten, bei denen es im Verlauf zum fulminanten Leberversagen kam, wurden aus differentialdiagnostischen Gründen unter sonografischer Kontrolle Leberbiopsien entnommen und diese unverzüglich zur Bearbeitung ins Labor gebracht. Dort erfolgte zum einen die Herstellung von Kryotomschnitten mit einer Stärke von etwa 7 µm für den Nachweis von M30. Biopate für den Nachweis von c-Jun und aktivierter Caspase wurden in Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom 3-5 µm dick geschnitten und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (OT) aufgezogen. Die Präparate wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Es erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung wie in Tabelle 10 beschrieben. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte im heißen Zitratpuffer 2 x 5 min bei 600 Watt (pH 6,0) behandelt. Anschließend folgte ein Bad für 10 min in H₂O₂ 3% in Methanol.

1	Schnitte bei 60°C 30 min in den Brutschrank stellen
2	3 x Xylol 5 min 2 x Ethanol 100% (je 5 min) 1 x Ethanol 90% (5 min) 1 x Ethanol 80% (3 min) 1 x Ethanol 70% (3 min)
3	Aqua destillata (5 min)

Tabelle 10: **Entparaffinieren der Schnitte**

Spülung mit Aqua dest. und TRIS-Puffer. Zur Bindung unspezifischer Ag wurden je Schnitt 50 µl Normalserum für 20 min aufgetragen. Durch Kippen des OT ließen wir das Serum ablaufen (nicht spülen!). Die Gefrierschnitte wurden über Nacht luftgetrocknet, anschließend 10 min in Aceton 4°C eingelegt, dann mit TRIS-Puffer und Tween 20 gespült.

4.3.2 Immunhistochemische Färbung

Die entparaffinierten, in PBS aufbewahrten Schnitte wurden wie folgt weiterbearbeitet:

1. Inkubation mit dem Primärantikörper

- A) Für M30: 50 µl 1:100 verdünnter Primärantikörper werden aufgetragen und 60 min bei 37°C inkubiert, anschließend Spülung in TRIS und Tween 20 2 x 5 min
- B) Für c-Jun: 50 µl 1:1000 verdünnter Primärantikörper 60 min bei Raumtemperatur, 1 x 2 und 1 x 3 min Spülen mit frischem TRIS-Puffer
- C) Für aktivierte Caspase 3: 50 µl 1:50 verdünnter Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubieren, 1 x 2 und 1 x 3 min Spülen mit frischem TRIS-Puffer

Antikörper	Herkunft	Klonalität	Detektionsmethode
M30	Roche Applied Sciences	monoklonal	Immunfluoreszenz
c-Jun	Santa Cruz	monoklonal	ABC-Methode
Anti-Caspase 3 <i>Active</i>	R&D Systems	polyklonal	ABC-Methode

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

2. Inkubation mit dem Sekundärantikörper

- A) Für M30: 50 µl biotinylierter Sekundärantikörper werden aufgetragen und 60 min Raumtemperatur inkubiert, Spülung in TRIS und Tween 20 2 x 5 min
- B) Für c-Jun: 50 µl Sekundärantikörper (monoklonal) 30 min bei Raumtemperatur, 1 x 2 und 1 x 3 min Spülen mit frischem TRIS-Puffer
- C) Für aktivierte Caspase 3: 50 µl Sekundärantikörper (polyklonal) 30 min bei Raumtemperatur 1 x 2 und 1 x 3 min Spülen mit frischem TRIS-Puffer

3. Fluoreszenzfarbstoff/Peroxidase

- A) Für M30: 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit Fluoreszenzkonjugat inkubieren, Spülung in TRIS und Tween 20 2 x 10 min
- B) Für c-Jun und C) aktivierte Caspase 3: 50 µl AB-Komplex 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, 1 x 2 und 1 x 3 min Spülen mit frischem TRIS Puffer, 100 µl DAB-Gebrauchslösung 7min inkubieren, 2 min mit Leitungswasser spülen, Gegenfärbung mit MAYER`s Hämatoxillin (Kernfärbung) für 2,5 min

4. Eindecken

- A) Für M30: Eindecken mit Vectashild (Vector Laboratories), Aufbewahrung im Kühlschrank bis zur Auswertung
- B) Für c-Jun und C) aktivierte Caspase 3: Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (siehe Tabelle 10, Schritt 2 von unten nach oben), Schnitte aus Xylol mit Roti-Histokitt TM (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eindecken

5. Mikroskopische Auswertung

- A) Für M30: Prüfung von je 5 repräsentativen Leberläppchen pro Biopat mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss Jena) bei 400facher Vergrößerung

- B) Für c-Jun und C) aktivierte Caspase 3: Prüfung von je 5 repräsentativen Leberläppchen pro Biopat mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Axiovert, Zeiss Jena) bei 100facher Vergrößerung

4.4 Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Software SigmaStat (Version 1.0 für Windows, Jandel Scientific, San Rafael, USA) erstellt. Es war zu untersuchen, ob statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Apoptosemarker in den verschiedenen Mittelwertgruppen vorhanden sind. Verwendetes Testverfahren war die ANOVA (*One Way Analysis of Variance* und *Two Way Analysis of Variance*) jeweils gefolgt von einer *post-hoc*-Adjustierung für multiples Testen nach Student-Newman-Keuls. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant, Unterschiede von $p < 0,01$ als hochsignifikant bewertet. Die grafischen Darstellungen der Datensätze erfolgten neben zeitlichen Verläufen hauptsächlich in Form von *boxplots*, die sich durch eine gute Beschreibung der Messwertverteilung auszeichnen. Die *box* wird durch eine horizontale Linie geteilt, die den Median darstellt. Hieraus sind die Symmetrie der Daten, Links- und Rechtschiefigkeit, gut ersichtlich. Die Höhe der *box* entspricht dem Interquartilsabstand als korrespondierendes Streumaß, indem 50% der Messwerte liegen. Die nachfolgende Grafik (Abbildung 11) beschreibt den Aufbau eines solchen *boxplots* und erklärt die verwendeten Symbole.

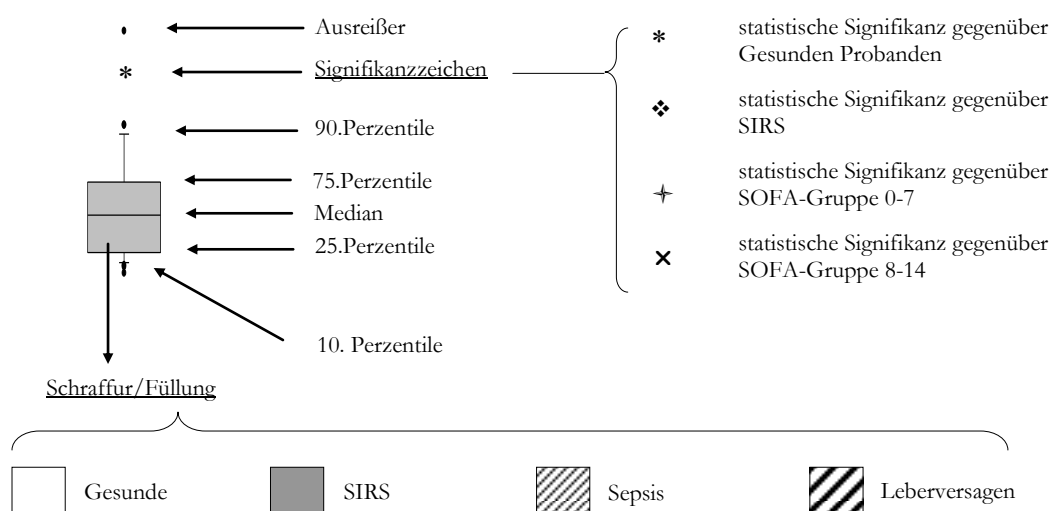


Abbildung 11: Erklärung der Darstellung der Plots

5. Ergebnisse

5.1 Allgemeines

Insgesamt wurden 51 an Sepsis, 41 an SIRS erkrankte Patienten und 15 weitere Patienten mit fulminantem septischem Leberversagen an durchschnittlich 16 Tagen sowie 10 gesunde Probanden untersucht. Die epidemiologischen Daten sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Kreisdiagramme in Abbildung 12 zeigen die jeweils zugrundeliegenden Krankheitsbilder, aus denen sich die Gruppe der Septiker und der SIRS-Patienten zusammensetzten.

Anzahl	Kontrolle (n=10)	SIRS (n=41)	Sepsis (n=51)
Alter in Jahren	23±3,0	68±8,8	62±13,6
Geschlechtsverhältnis (M/F)	5/5	31/10	31/20
Letalität (%)	0	17	45

Tabelle 12: **Patientencharakteristika**

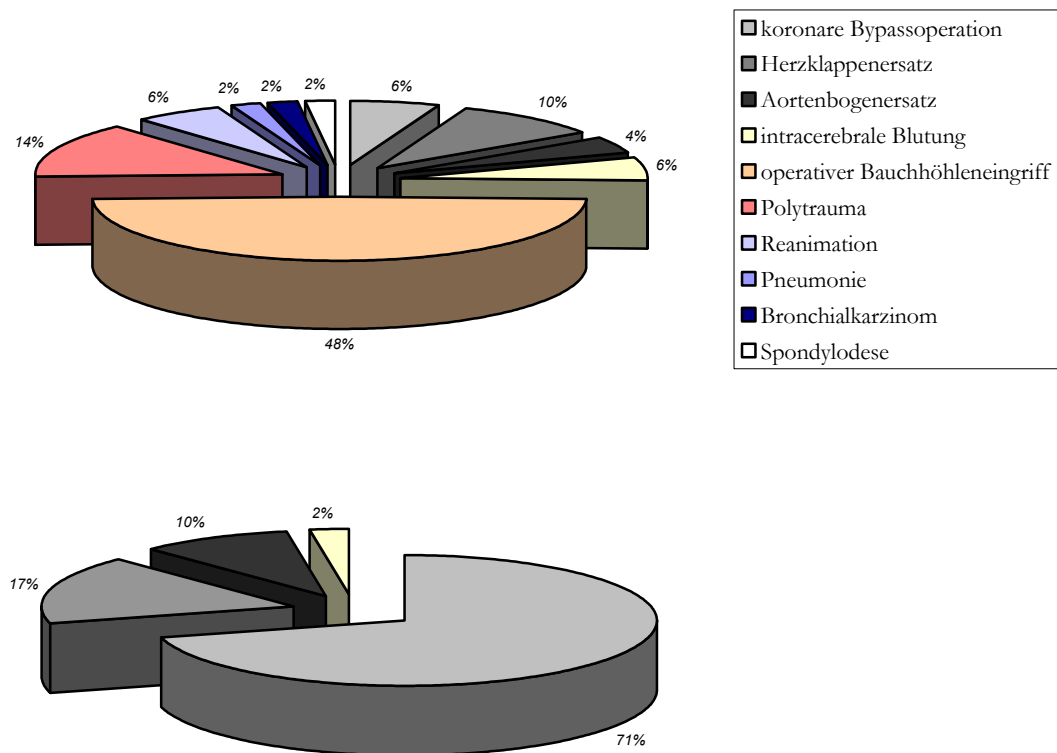
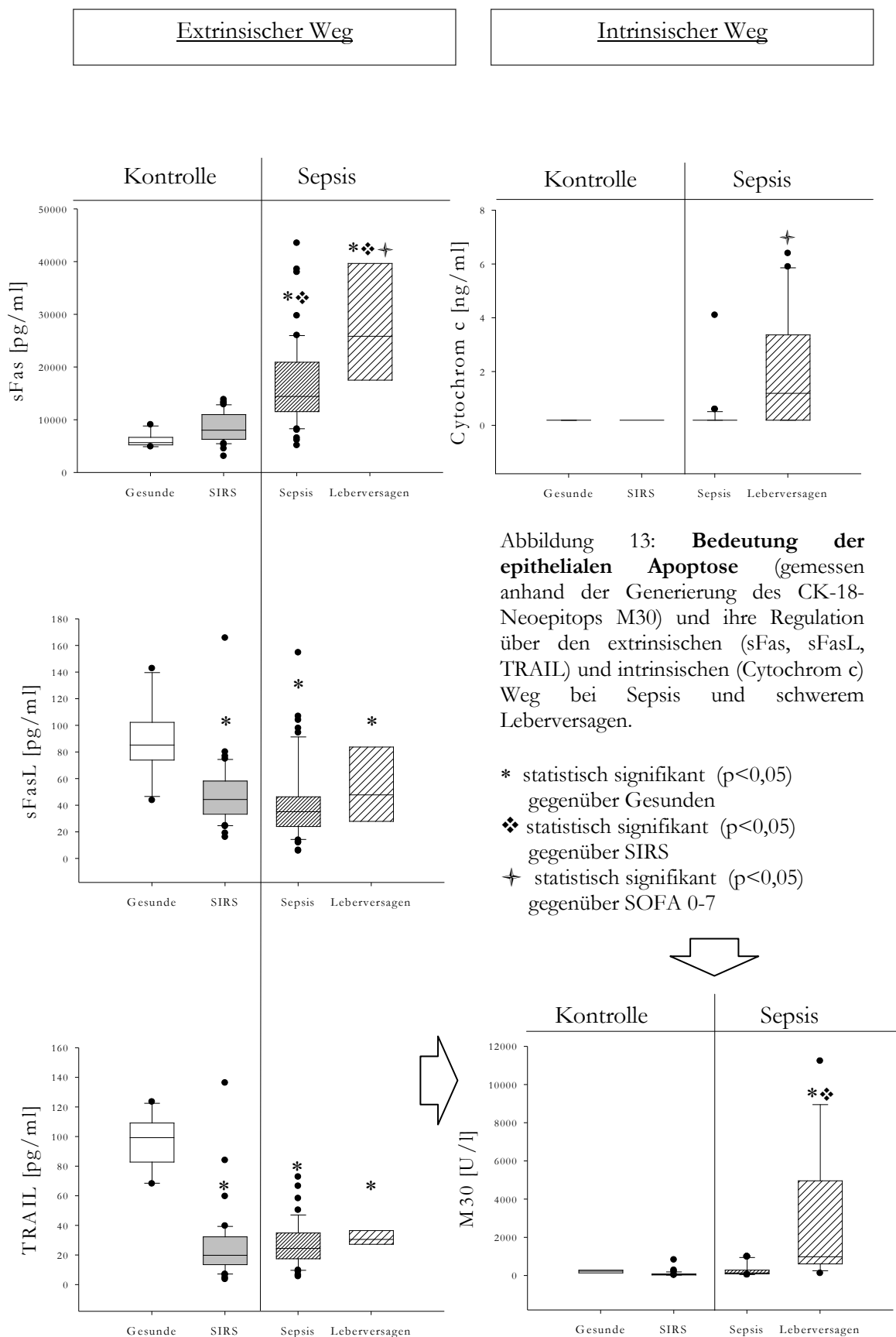


Abbildung 12: **Zusammensetzung der zugrundeliegenden Krankheitsbilder bei Sepsis (oberes Kreisdiagramm) und SIRS (unteres Kreisdiagramm)**

5.2 Übersicht



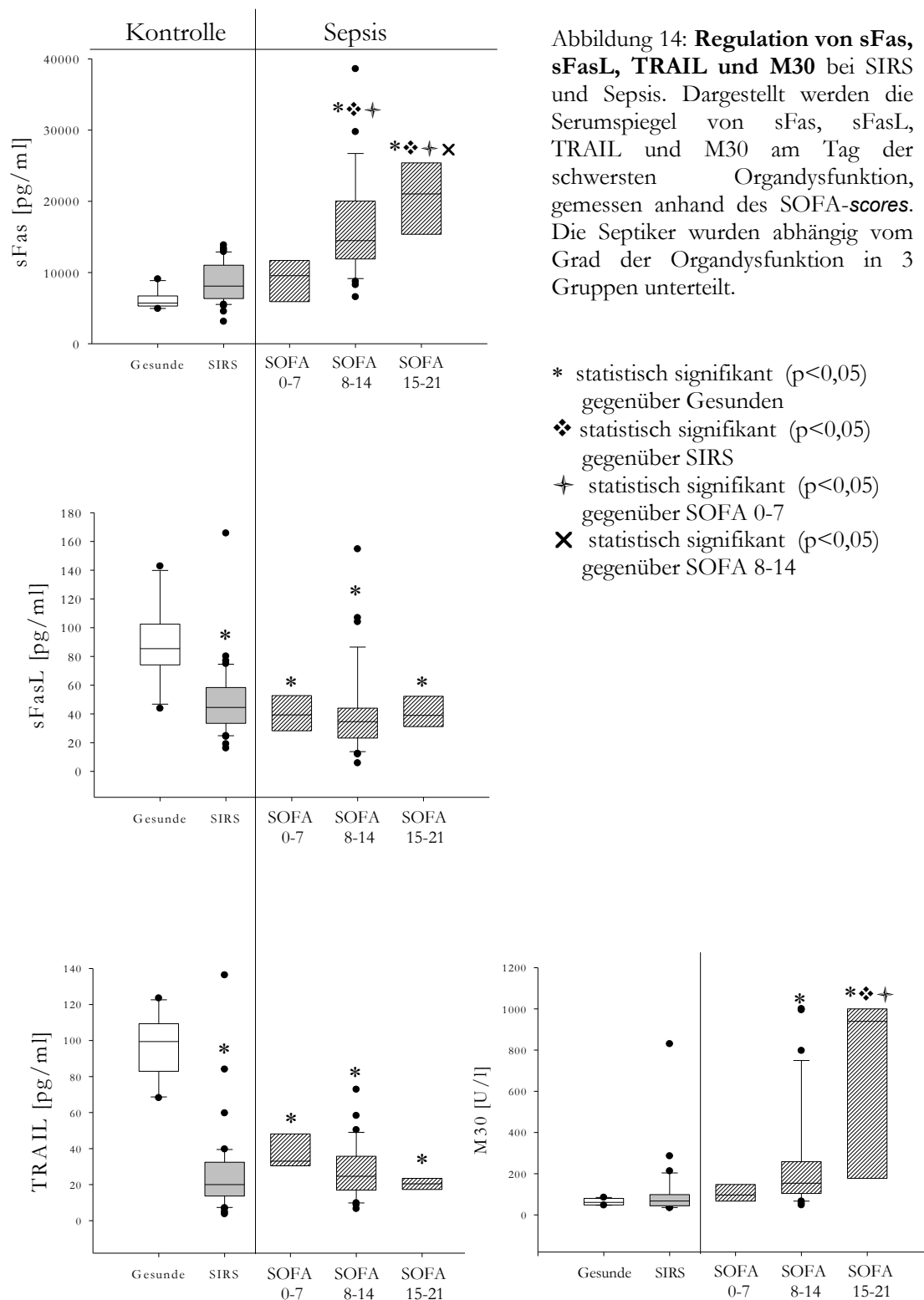
Zunächst erfolgte eine orientierende Messung der Apoptosemarker des extrinsischen (sFas, sFasL, TRAIL) und intrinsischen Weges (Cytochrom c) sowie die Messung von M30 zur Quantifizierung des epithelialen Apoptosegrades bei der Kontrollgruppe, den SIRS-Patienten, Septikern und den Patienten mit Leberversagen (Abbildung 13).

Es zeigte sich, dass die Serumkonzentrationen des antiapoptotisch wirkenden sFas bei septischer Genese verglichen mit denen nicht-infektiöser systemischer Entzündung höher lagen.

Nur die Serumkonzentrationen von sFas als löslicher Marker der TNF/TNFR-Familie lagen über den Werten gesunder Probanden, wohingegen die Serumkonzentrationen von sFasL und TRAIL deutlich darunter lagen. Eine Zunahme des Caspasespaltproduktes M30 im Serum war lediglich bei schwerstem Organversagen zu beobachten.

Im nächsten Schritt wurden die Serumspiegel der Septiker der Schwere des Organversagens (gemessen anhand des SOFA-**scores**) gegenübergestellt (Abbildung 14).

Hierbei konnte eine Abhängigkeit für die sFas-Serumspiegelhöhe vom Ausmaß der Organdysfunktion nachgewiesen werden. Ab SOFA-Werten von 8-14 war diese Abhängigkeit statistisch signifikant gegenüber den Kontrollen (Gesunde und SIRS). Während der TRAIL-Spiegel einen leichten Trend zu fallenden Werten bei zunehmender Einschränkung der Organfunktion zeigte, wiesen die sFasL-Werte keine Abhängigkeit von der Krankheitsschwere auf.



5.3 Zeitlicher Verlauf der Serumspiegel der Apoptosemarker

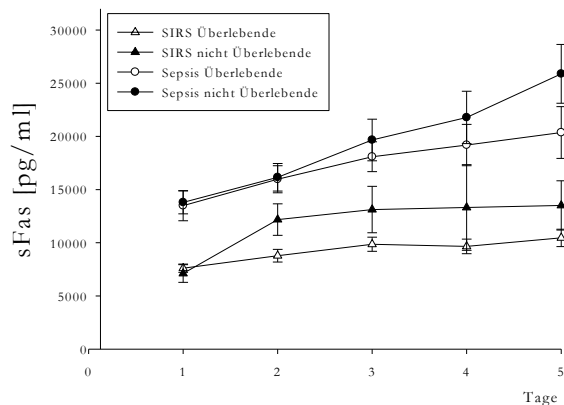
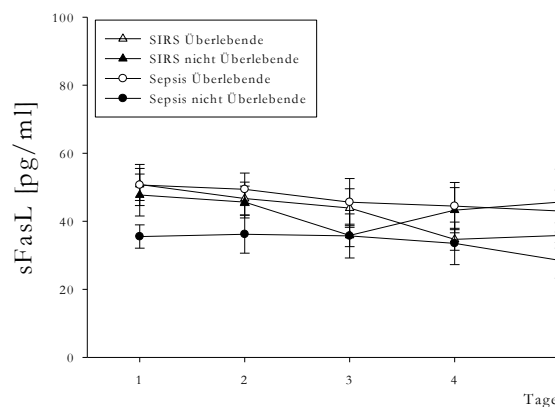
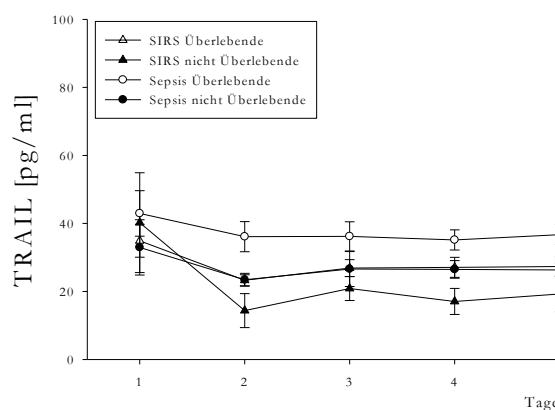


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Serumspiegel der Apoptosemarker des extrinsischen Weges (sFasL, sFas und TRAIL) über 5 Tage bei SIRS-Patienten und Septikern.

Überlebende sind durch ungefüllte Symbole, nicht überlebende Patienten durch schwarze Symbole dargestellt.



+Standardabweichung
 Mittelwert
 -Standardabweichung



Bei den untersuchten Patienten wurden die Apoptosemarker beginnend am Tag der Diagnosestellung an durchschnittlich 16 Tagen bestimmt, um Schwankungen im Krankheitsverlauf zu erfassen. Nachträglich wurden die Patienten in Überlebende und nicht Überlebende eingeteilt.

Für die grafische Wiedergabe des zeitlichen Verlaufs wurde schließlich ein Zeitraum von 5 Tagen gewählt. Zugrunde liegt die Tatsache, dass jenseits der 5 Tage ein großer Teil der Sepsispatienten bereits verstorben war und viele SIRS-Patienten von Intensiv- auf Normalstation verlegt werden konnten, so dass die Fallzahlen nach dem 5. Tag geringer waren und die Werte somit einer großen Streuung unterliegen.

Im zeitlichen Verlauf war ein wesentlicher Anstieg des sFas-Serumspiegels bei Sepsis im Vergleich zum nicht-infektiösen SIRS zu verzeichnen. Des Weiteren wurden signifikant höhere sFas-Spiegel bei Patienten beider Gruppen gefunden, die im Verlauf starben.

Während der Verlauf von sFasL inkonstante Ergebnisse lieferte, schien TRAIL im Rahmen der systemischen Inflammation supprimiert.

5.4 Apoptosemarker in Korrelation zu den SOFA-*Subscores*

Die folgenden Grafiken stellen den Zusammenhang zwischen Serum-Spiegeln der Apoptosemarker und Schwere der Einzelorgandysfunktion, objektiviert anhand des SOFA-*Score*-System, dar.

Die gemessenen Werte wurden dem Gesamt-SOFA und getrennt nach Organfunktion, den SOFA-*Subscores* des jeweiligen Patienten am Tage der Probengewinnung gegenübergestellt.

Eine detaillierte Übersicht über die Zusammensetzung der SOFA-Punktwerte bietet Tabelle 8 (Seite 30 im Kapitel 4 Material und Methoden). In den Übersichten sind die SOFA- *Subscores* 1 und 2 sowie 3 und 4 zusammengefasst. Ebenfalls dargestellt sind Messwerte einer Kontrollgruppe von 10 gesunden Probanden.

5.4.1 sFas in Korrelation zu den einzelnen SOFA-Subscores

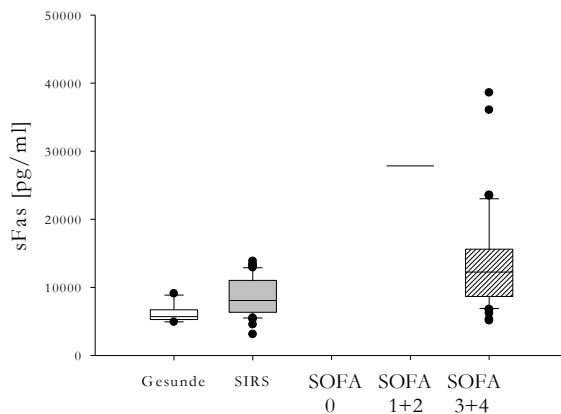


Abbildung 16: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Herz-Kreislaufsystem.

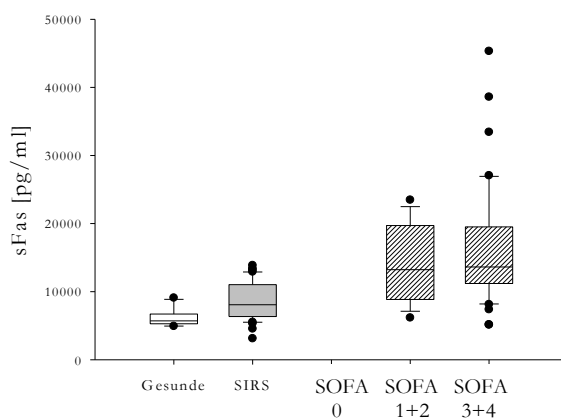


Abbildung 17: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Atmungssystem.

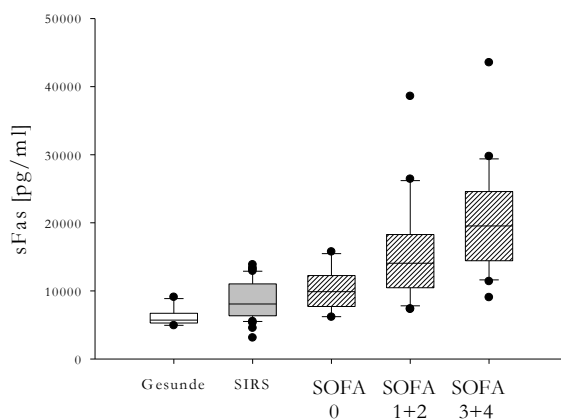


Abbildung 18: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Nierenfunktion.

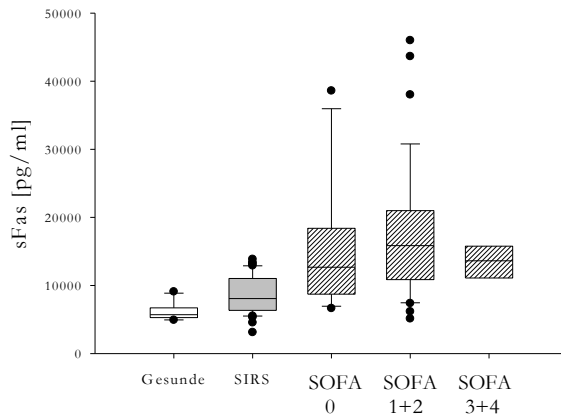


Abbildung 19: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Gerinnung.

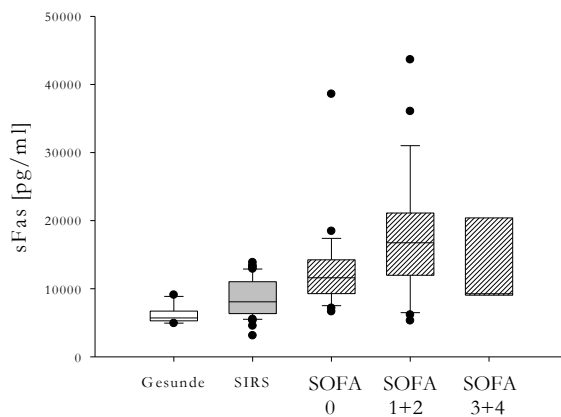


Abbildung 20: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Leberfunktion.

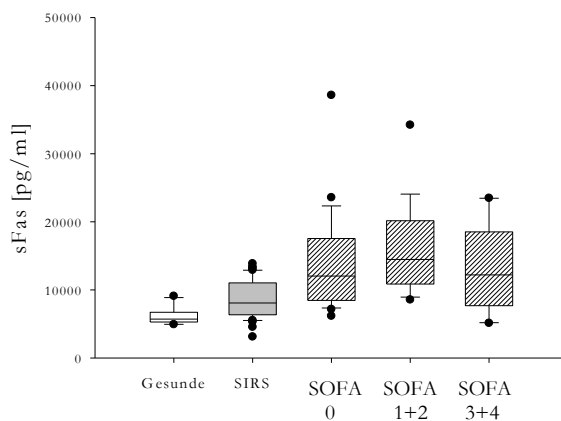


Abbildung 21: **sFas-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Funktion des Zentralen Nervensystems (GLASGOW-Coma-Scale).

5.4.2 sFasL in Korrelation zu den einzelnen SOFA-Subscores

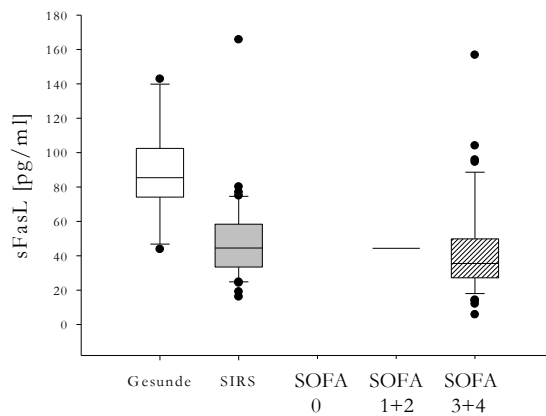


Abbildung 22: sFasL-Serumspiegel bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Herz-Kreislaufsystem.

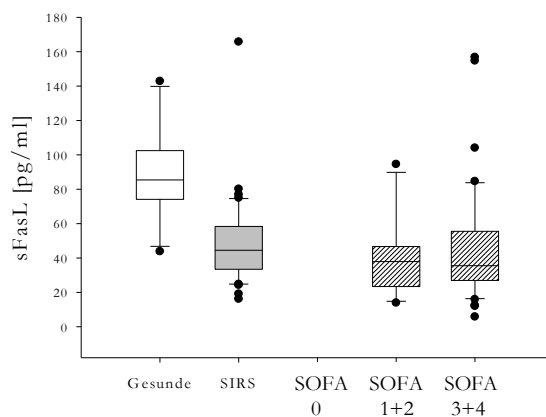


Abbildung 23: sFasL-Serumspiegel bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Atmungssystem.

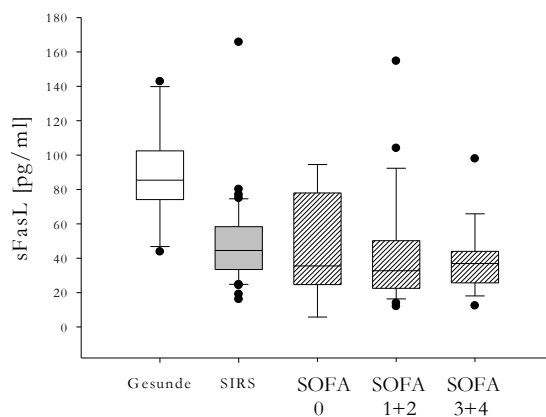


Abbildung 24: sFasL-Serumspiegel bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Nierenfunktion.

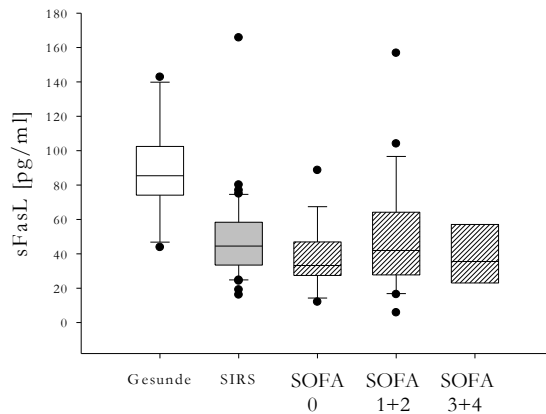


Abbildung 25: **sFasL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Gerinnung.

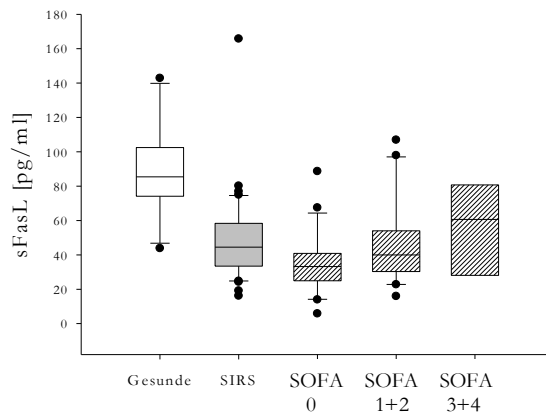


Abbildung 26: **sFasL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Leberfunktion.

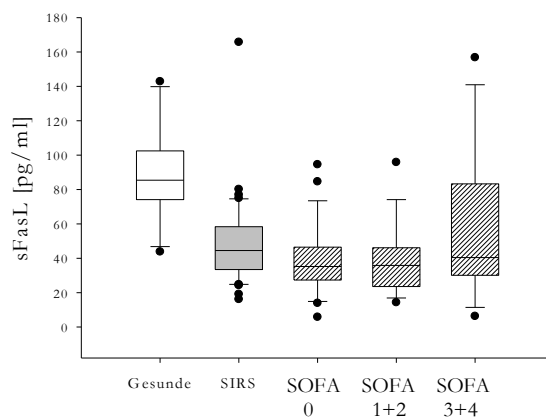


Abbildung 27: **sFasL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Funktion des Zentralen Nervensystems (GLASGOW-Coma-Scale).

5.4.3 TRAIL in Korrelation zu den einzelnen SOFA-Subscores

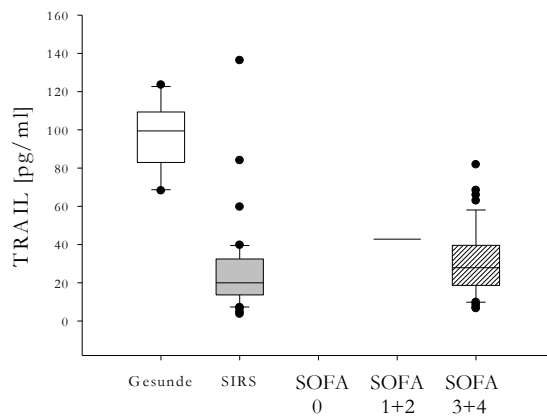


Abbildung 28: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Herz-Kreislaufsystem.

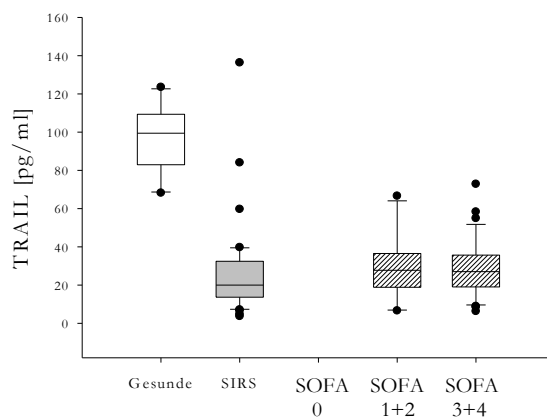


Abbildung 29: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Atmungssystem.

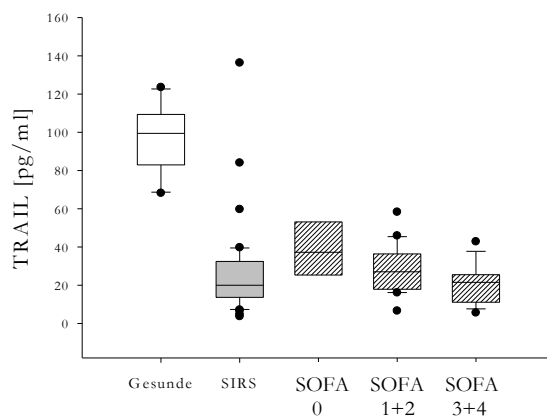


Abbildung 30: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Nierenfunktion.

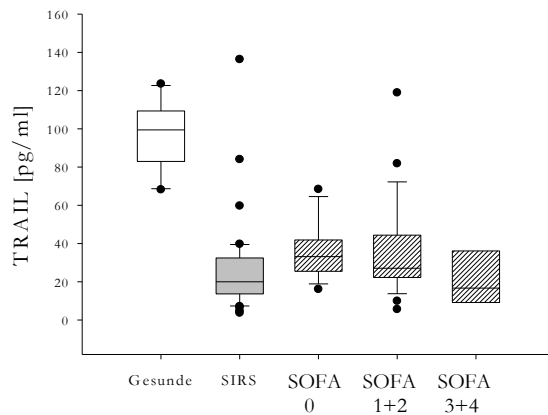


Abbildung 31: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Gerinnung.

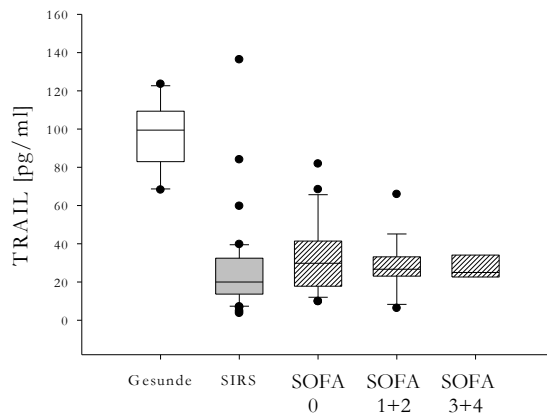


Abbildung 32: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Leberfunktion.

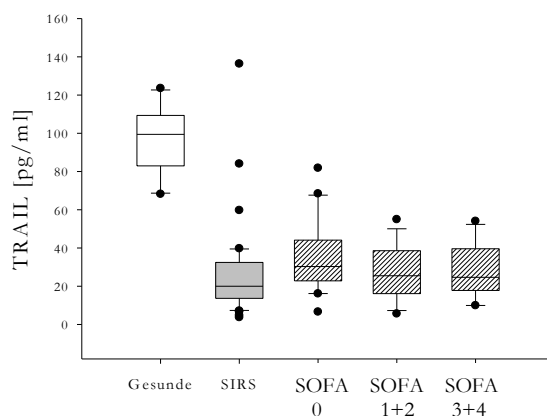


Abbildung 33: **TRAIL-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore Funktion des Zentralen Nervensystems (GLASGOW-Coma-Scale).

5.4.4 M30 in Korrelation zu den einzelnen SOFA-Subscores

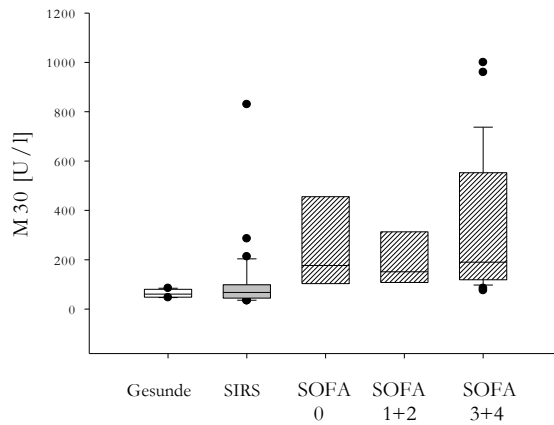


Abbildung 34: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore **Herz-Kreislaufsystem**.

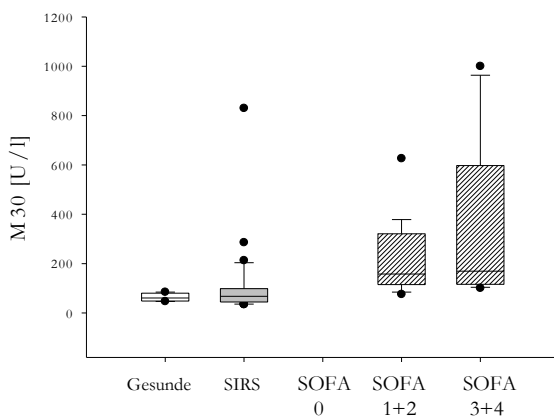


Abbildung 35: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore **Atmungssystem**.

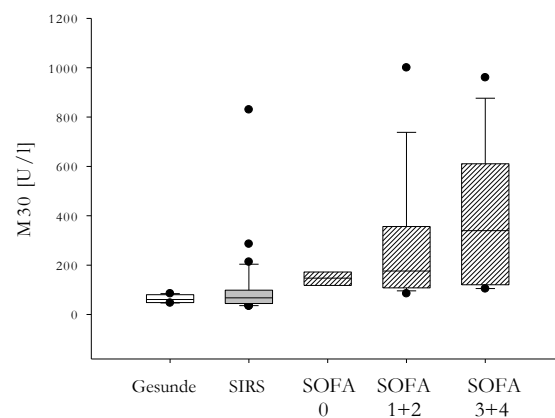


Abbildung 36: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-Subscore **Nierenfunktion**.

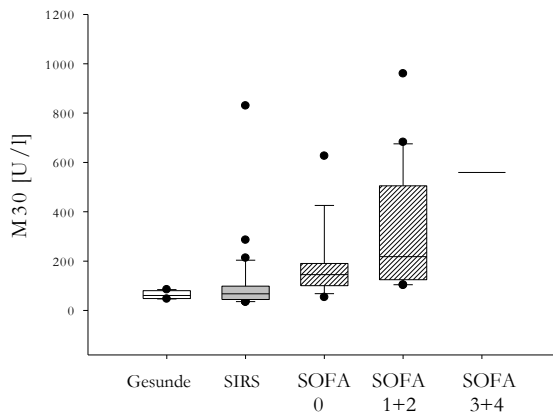


Abbildung 37: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-**Subscore Gerinnung**.

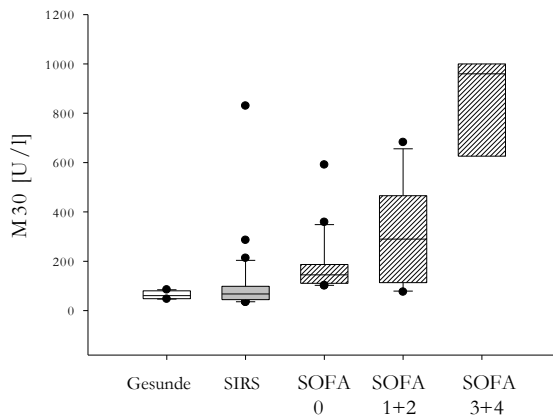


Abbildung 38: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-**Subscore Leberfunktion**.

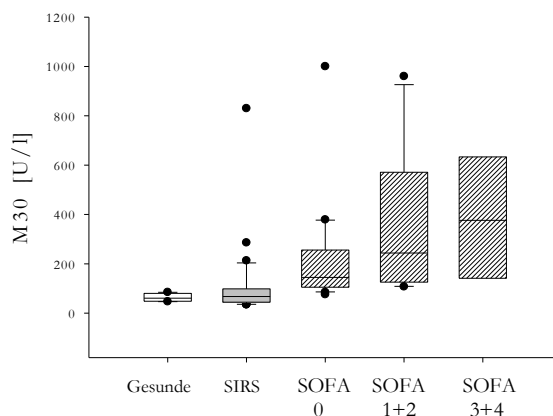


Abbildung 39: **M30-Serumspiegel** bei Gesunden, SIRS-Patienten und Septikern in Korrelation zum SOFA-**Subscore Funktion des Zentralen Nervensystems (GLASGOW-Coma-Scale)**.

Die Serum-Spiegel der Apoptosemarker wurden der Schwere der Einzelorgandysfunktion, (gemessen anhand des SOFA-Scores) mit der Frage gegenübergestellt, ob die Expression bzw. das Erscheinen des Apoptosemarkers auf das Versagen eines speziellen Organsystems zurückzuführen ist. Hierbei nahmen vor allem die Nieren- und die Leberfunktion einen besonderen Stellenwert ein. Für antiapoptotisches sFas korrelierte der Anstieg mit einer abnehmenden Nierenfunktion (Abbildung 18), während das proapoptotische sFasL mit zunehmender Leberdysfunktion vermehrt im Blut nachweisbar war und sich damit der Kontrollgruppe näherte (Gesunde und SIRS-Patienten)(Abbildung 26).

Für TRAIL hingegen ließ sich ein Trend zu sinkenden Serumspiegeln bei abnehmender Nierenfunktion darstellen (Abbildung 30). Die Spaltprodukte des Cytokeratin 30 als Marker epithelialer Apoptose korrelierten positiv mit abnehmender Atmungs-, Nieren-, Leberfunktion, sowie abnehmender Funktion des zentralen Nervensystems.

Für die übrigen Organsysteme waren jeweils keine Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Erscheinen der Apoptosemarker im Blut festzustellen.

5.5 Immunhistologie der Leberbiopate

Die Leberbiopate von 3 Patienten mit fulminantem Leberversagen wurden histologisch und immunhistochemisch zum Nachweis der Apoptose-relevanten Proteine M30 und aktiver Caspase 3 aufgearbeitet.

Beide Marker des apoptotischen Zelltodes wurden bei schwerem Leberversagen verstärkt exprimiert. Während aktivierte Caspase 3 überwiegend im perivenösen und mittleren Teil des Leberläppchens lokalisiert war (Abbildung 40, A+B), wurde Zytokeratin-18 hauptsächlich in perivenösen Regionen des Acinus beobachtet (Abbildung 40, C-E). Die perivenösen Anteile des Leberläppchens stellen die sogenannten „letzten Wiesen“, das heißt die zuletzt mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgten Regionen, des Organs dar. Das Leberläppchen wird aus Richtung eines GLISSON'schen Dreiecks aus einem Pfortaderast und einem Ast der *Arteria hepatica* mit Blut versorgt.

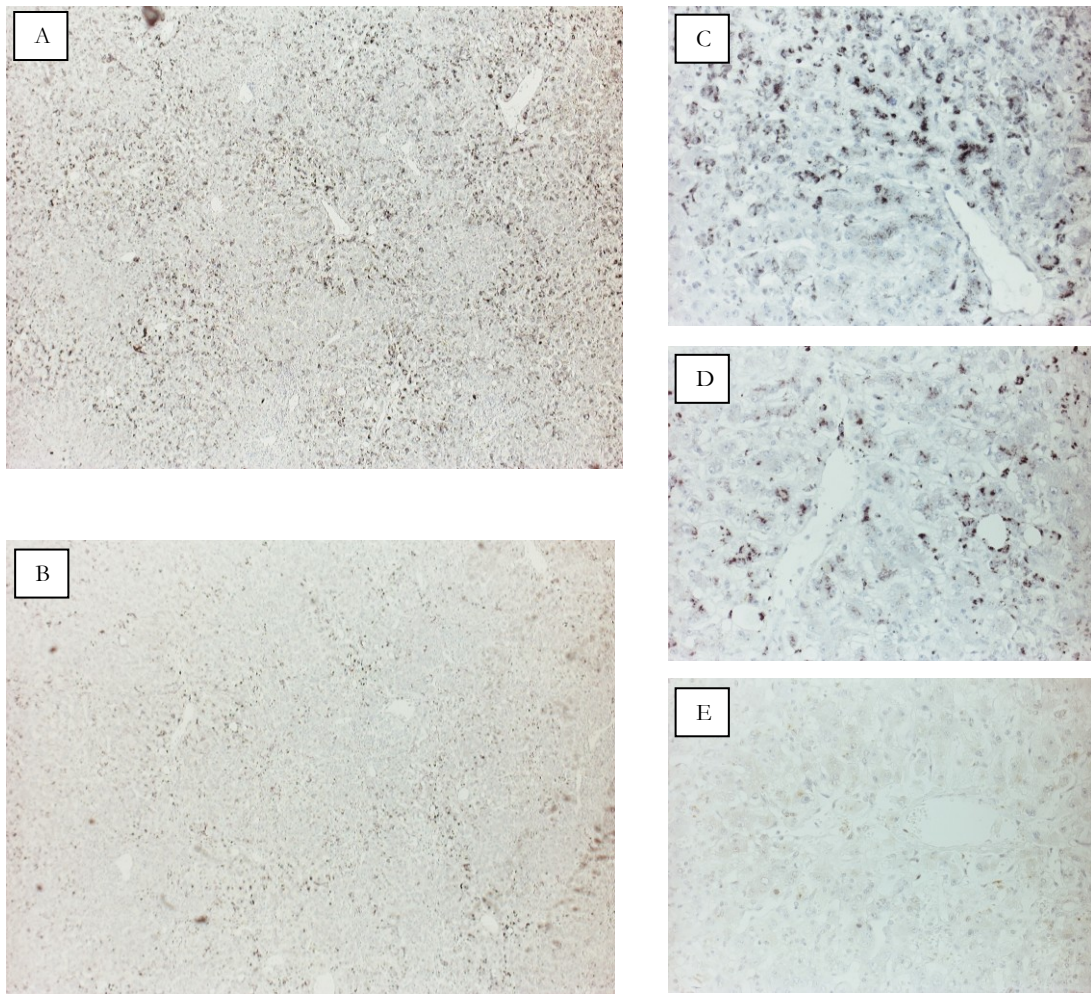


Abbildung 40: **Räumliche Verteilung apoptotischer Zellen bei fulminantem Leberversagen.** Die humanen Leberbiopsate wurden immunhistochemisch auf aktivierte Caspase 3 (linke Bildhälfte A+B) und Zytokeratin-18-Neoepitop (rechte Bildhälfte C, D + E) untersucht.

6. Diskussion

6.1 Methodenkritik

In der vorliegenden Studie wurden Apoptose-regulierende Proteine des extrinsischen und intrinsischen Weges im Serum von Sepsis- und SIRS-Patienten, von Patienten mit septischem Leberversagen sowie gesunden Probanden untersucht. Um die Aktivierung der Apoptose-Signalkaskaden systematisch zu messen, wurden die Serumspiegel ausgewählter Mitglieder der TNF-Superfamilie (sFas, sFasL, TRAIL) für den extrinsischen, des Cytochrom c für den intrinsischen Weg und das Caspase-Spaltprodukt des Cytokeratin 18 (M30) gemessen und mit der Krankheitsschwere korreliert. Zusätzlich wurden exemplarisch die Leberbiopate von 3 Patienten mit fulminantem septischen Leberversagen auf ihre Expression von M30 und aktivierte Caspase 3, einem Vollstreckerenzym der Apoptose, untersucht.

6.1.1 Wahl der Apoptosemarker

Das Fas-Rezeptor-System, seine Signaltransduktion und seine Rolle bei Sepsis sind durch zahlreiche Studien gut belegt (NAGATA, 1994; KRAMMER, 2000; MARSIK, 2003; DeFREITAS, 2004). Insbesondere an der hepatozellulären Apoptose, z.B. im Rahmen viraler Hepatitiden oder beim septischen Leberversagen soll die Fas/FasL-Interaktion beteiligt sein (TANNAHILL, 1999; XIA QIN, 2001; DOUGHTY, 2002).

Sowohl sFasL, das von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, (SERRAO, 2001) als auch agonistische Fas-Antikörper induzieren einen Hepatozytenuntergang (OGASAWARA, 1993; SCHNEIDER, 1998). Bislang erfolgten Untersuchungen hauptsächlich an Geweben, die durch Biopsien - eine für den Patienten belastende und risikoreiche Maßnahme - entnommen werden müssen. sFas und sFasL, als im Serum messbare Marker des Fas-Rezeptor-Systems, wurden deshalb zum einen mit der Fragestellung ausgewählt, ob ihre Serumspiegel Hinweise auf Apoptose und Organschädigung geben können und zum anderen, ob sich hieraus Rückschlüsse auf die Prognose stellen lassen. Des Weiteren sollte die Bedeutung des Fas-Systems in der hepatozellulären Apoptose beim Multiorganversagen weiter eruiert werden.

TRAIL hat in den letzten Jahren vor allem auf dem Gebiet der Krebsforschung immense Bedeutung erlangt. Grund hierfür ist die Fähigkeit der löslichen Form (sTRAIL) in einem breiten Spektrum humaner Krebszelllinien Apoptose zu induzieren (BAETU, 2002). Im

Bereich intensivmedizinischer Krankheitsbilder, speziell der Sepsis und ihr verwandten Erkrankungen wie SIRS, ist über TRAIL und seine Rezeptoren bislang wenig bekannt.

TRAIL hat einen hohen Anteil von Sequenzhomologien zu TNF- α und Fas, zwei Molekülen, deren Rolle in der Pathogenese der Sepsis gesichert ist (PAPATHANASSOGLU, 2000). Die Bedeutung von TRAIL in diesem Zusammenhang sollte daher durch die vorliegende Arbeit intensiver beleuchtet werden.

Cytochrom c gilt als ein Marker der mitochondrialen Apoptose. Das Molekül ist physiologischerweise lose mit der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran assoziiert. Der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) folgt das Ausströmen von Cytochrom c durch Porenkomplexe ins Zytoplasma (DANIAL 2004; HÄCKER, 2007). Bei Gesunden liegt Cytochrom c mit den kommerziell erhältlichen Tests unterhalb der Nachweisgrenze.

Eine Einschränkung dieses, aber auch anderer mitochondrialer Marker ist, dass diese auch sekundär, das heißt nach Initiierung des Apoptoseweges durch einen Todesrezeptor, den ER-Stress-Weg oder den lysosomalen Weg, freiwerden. Letztlich gibt es auch Hinweise, dass Cytochrom c bei Nekrose freigesetzt wird (LI, 1999). Der Nachweis deutet darauf hin, dass die mitochondriale Wand durchlässig ist und die Inhaltsstoffe frei werden. Der Verdacht, dass es sich um apoptotischen Zelltod handelt, sollte durch weitere Marker, wie M30 oder aktivierte Caspase 3, untermauert werden.

Nach Induktion des PCD kommt es zur Aktivierung von Initiatorcaspasen, die nachfolgend Effektorcaspasen, zu denen die Caspasen 3, 6 und 7 zählen, aktivieren. Die Effektorcaspasenaktivierung repräsentiert im Signaltransduktionsprozess der Apoptose den „*point of no return*“, d.h. die Auslösung des PCD ist ab diesem Zeitpunkt irreversibel (WAGENER, 1999). Der Nachweis der aktivierten Caspase 3 eignet sich daher, um das Anlaufen des Apoptoseprogramms in der Zelle zu bestätigen. Einschränkend scheint die Existenz von Caspase-unabhängigen Zelltodformen zu sein, bei denen per Definition keine Caspasenaktivierung erfolgt, aktivierte Caspase 3 also nicht nachweisbar wäre (SUSIN, 1999; KROEMER & MARTIN, 2005). Hierbei sind andere Moleküle als die Caspasen, wie z.B. Calpaine, Cathepsine und Apoptose-induzierende Faktoren (AIF) an der Exekution des Zelltodes beteiligt. Wie eingangs beschrieben, werden sie zusammen mit Caspase-aktivierenden Molekülen bei den verschiedenen Zelltodformen (lysosomal, mitochondrial) frei, sodass eine parallele Caspasenaktivierung möglich und wahrscheinlich scheint. Caspase 3 kann sowohl nach Entrierung des Rezeptor- als auch des mitochondrialen Weges aktiviert werden.

M30 schließlich, das als früher Apoptosemarker epithelialer Zellen durch Caspase-abhängige Spaltung aus dem Zellskelettbaustein Cytokeratin entsteht, wurde zum einen ausgewählt um zu klären, ob epitheliale Apoptose, zum Beispiel beim Leberversagen anhand des M30 im Serum nachweisbar ist, ferner um festzustellen, ob die Höhe des messbaren Serumspiegels Rückschlüsse auf den Grad der Organschädigung zulässt (LEERS, 1999). M30 ist ein kosteneffizient und einfach zu bestimmender Parameter.

Selbst wenn die Auswirkungen der Sepsis bei Untersuchungen am Patienten vergleichbar sind, spiegeln Unterschiede der gemessenen Apoptosemarker nicht notwendigerweise einen spezifischen Effekt der Sepsis wider, da eine Standardisierung des Ausmaßes der Sepsis nur bedingt möglich ist (z.B. durch SOFA-**Score**-System). Zudem ist davon auszugehen, dass die individuelle Reaktionsweise differiert, beziehungsweise zusätzlich andere Einflussfaktoren vorliegen (z.B. kann der Nachweis von apoptotischen Hepatozyten bei Sepsis auch einer koexistenten Hepatitis geschuldet sein). Genetische Unterschiede könnten die Ergebnisse ebenso beeinflussen wie die unterschiedlichen Sepsiserreger.

6.1.2 Nachweis der Apoptosemarker mit ELISA und Immunhistochemie

Welche Zellpopulationen und in welchem Ausmaß diese bei Sepsis und SIRS apoptotisch werden, wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen in *in vivo* und *in vitro* Studien untersucht. Neben den zahlreichen tierexperimentellen Arbeiten können die derzeit am Menschen verfügbaren Studien in 3 Gruppen unterteilt werden:

1. Histologische Untersuchungen in Gewebsschnitten/Biopsaten/Lavage (DOUGHTRY, 2002; PAXIAN, 2004; MARTIN, 2005)
2. Untersuchungen an Zellkulturen (JABER, 2001)
3. Bestimmung Apoptose-spezifischer Marker im Blut (JABER, 2001; LE TULZO, 2002; MARSIK, 2003; DE FREITAS, 2004)

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Diese beruhen auf dem Nachweis von Veränderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und Transportfunktion der Plasmamembran, der Funktion von Zellorganellen, der endonukleolytischen DNA-Fragmentierung oder auch der Degradation von Zytoskelettproteinen durch Caspasen.

Immunologisch gestützte Messverfahren, die auf der hochspezifischen Reaktion von Antikörpern mit ihrem entsprechenden Antigen beruhen, besitzen im Nachweis Apoptose-

spezifischer Proteine eine große Sensitivität und Spezifität. Sowohl die in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Untersuchungen als auch das ELISA-Verfahren machen sich das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze.

Die Serumkonzentrationen der Apoptosemarker (sFas, FasL, TRAIL, Cyt c, M30) wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Testsystemen gemessen. Validierte Protokolle zur Probengewinnung, -lagerung und -verarbeitung standen von Seiten der Hersteller zur Verfügung. Die Proben wurden direkt nach der Blutentnahme verarbeitet. Pro Messreihe stand mindestens ein Aliquot zur Verfügung, das erst unmittelbar vor Verarbeitung aufgetaut wurde. Reste wurden verworfen. Somit ist auszuschließen, dass unbrauchbares Untersuchungsmaterial zur Analyse herangezogen wurde. Um systematische Fehler zu vermeiden wurde auf jeder Mikrotiterplatte je eine Richtigkeits-Kontrollprobe für den hohen und eine für den niedrigen Messbereich mitgeführt. Die Messwerte für die einzelnen Patienten wurden in Doppelbestimmung erhoben. Nur bei Abweichung um nicht mehr als 10 % wurde der Mittelwert errechnet und für die Studie herangezogen.

Die Intra- (Interassay) Variationskoeffizienten lagen mit 2,8% (6,1%) für TRAIL, 2,9% (3,9%) für sFas, 4,1% (8,8%) für FasL und 4,1% (5,0%) für Cyt c innerhalb der geforderten Toleranzbereiche.

Die Probenaufbereitung nach Gewinnung der Leberbiopate erfolgte ebenfalls unverzüglich, um falsch zu hohe Apoptose-/Nekroseraten zu vermeiden.

6.2 Bedeutung der Apoptose beim septischem Multiorganversagen

Die Apoptose ist ein lebensnotwendiger Prozess. Beim Gesunden bildet sie die Grundlage einer geregelten Embryogenese, der Gewebshomöostase und der Immunfunktion. Doch auch bei vielen Krankheitsbildern spielt sie eine tragende Rolle. Sie kann von Vorteil für den Organismus sein, zum Beispiel, wenn sich eine Virus-infizierte Zelle zum Schutz benachbarter Zellen durch Expression von Apoptose-transduzierenden Rezeptoren dem Zelltod ausliefert. Bei anderen Krankheiten wiederum, wie denen des neurodegenerativen Formenkreises, kommt es durch pathologische Apoptose zum Untergang funktionellen Gewebes mit Schädigung des Gesamtorganismus (KOPITO, 2000).

Patienten im Vollbild der Sepsis zeigen ebenfalls Veränderungen im Ablauf der Apoptose verschiedener Zellpopulationen. Die Bedeutung dieses Zelluntergangs wird bislang kontrovers diskutiert (OBERHOLZER, 2001; DE FREITAS, 2004).

6.2.1 Epitheliale Apoptose lässt sich anhand des M30 nachweisen

Nach Aktivierung der Caspasen-Kaskade kommt es zum enzymatischen Abbau der DNA und des Zellgerüsts. Ein Gerüstbaustein epithelialer Zellen ist das Cytokeratin 18, das im Zuge der Apoptose am Aspartatsäurerest 396 durch die Caspasen 3, 7 und 9 gespalten wird (LEERS, 1999). Das hierbei entstehende Ck18Asp396 wird als M30 bezeichnet, ein Neo-Epitop, das in einer frühen Phase der Apoptose, zeitlich noch vor der DNA-Fragmentation, an der Zelloberfläche präsentiert und ins Serum freigesetzt wird (CAULIN, 1997).

M30 ist weder auf überlebensfähigen geschädigten, noch auf nekrotischen Zellen nachweisbar, was das Neoepitop als einen hochspezifischen Marker für Apoptose epithelialer Zellen auszeichnet. Darüber hinaus korreliert seine Ausprägung mit dem TUNEL-Apoptoseindex (LEERS, 1999; CHIU, 2001). Signifikant erhöhte Serumspiegel lassen sich nach ROTH bei Septikern nachweisen. Auch Trauma-Patienten zeigten im Vergleich zu Gesunden hohe M30-Werte, die mit der Mortalität korrelierten (ROTH, 2004a). Epitheliale Apoptose bei Sepsis konnte in Gefäßendothelien (ROTH, 2004a; ZHOU, 2004), Thymusgewebe (LE TULZO, 2002), Darmmukosa (HOTCHKISS, 2001a; COOPERSMITH, 2002) und Lungenepithelien (KRAMMER, 2000; HOTCHKISS, 2001b; DOSREIS, 2004; NAKAMURA, 2004) nachgewiesen werden.

Auch Hepatozyten sind epithelialen Ursprungs. Folglich müsste im Falle des apoptotischen Untergangs M30 auf der Zelloberfläche und im Serum nachweisbar sein. Tatsächlich zeigten Patienten im Leberversagen mit klinisch gestellter Indikation zum Leberersatzverfahren erhöhte M30-Spiegel (Abbildung 13). Durch den parallelen immunhistochemischen Nachweis von M30 bei 3 solcher Patienten konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten von Apoptose betroffen sind (Abbildung 40). Hieraus ließe sich also schlussfolgern, dass der M30-Spiegel im Zusammenhang mit einer Leberdysfunktion bei Sepsis auf einen hepatozellulären Untergang durch Apoptose hinweist.

Diskutiert werden muss jedoch auch die Möglichkeit, dass weitere M30-Quellen vorliegen. Vergleicht man die **Subscores** der einzelnen Organsysteme in Korrelation zum M30-Spiegel (Abbildung 34-39), zeigen sich jedoch die höchsten Werte beim Leberversagen mit der engsten Korrelation zum Schweregrad (Abbildung 38). Ein tendenzieller Anstieg war auch im Zusammenhang mit der Funktion des Zentralen Nervensystems zu verzeichnen (Abbildung 39). Eine Funktionsstörung des Gehirns bei Leberversagen, die als hepatische Enzephalopathie bekannt ist, könnte hiermit in Verbindung stehen. Auch für eine abnehmende Nierenfunktion ließ sich ein Anstieg von M30 verfolgen (Abbildung 36). Dieser Sachverhalt wurde erst kürzlich durch eine Forschungsgruppe um MESSARIS

untersucht. Ratten, bei denen eine durch Darmperforation induzierte Sepsis mit renaler Dysfunktion vorlag, zeigten einen vermehrten Tubuluszelluntergang. Dies war sowohl mikroskopisch als auch anhand des M30-Spiegels im Serum nachweisbar (MESSARIS, 2008).

6.2.2 Die Apoptose - ein streng reguliertes Selbstmordprogramm der Zelle

Patienten im Vollbild der Sepsis zeigen Veränderungen des Ablaufs der Apoptose bestimmter Zellpopulationen (KRAMMER, 2000a; HOTCHKISS, 2001b; DOSREIS, 2004; NAKAMURA, 2004). So konnte zunächst im Tiermodell (WANG, 1994; AYLA, 1996), später auch beim Menschen (HOTCHKISS, 1999a; LE TULZO, 2002; WEBER, 2004) gezeigt werden, dass zirkulierende und gewebeständige Lymphozyten einer gesteigerten Apoptose unterliegen. Folge ist eine Beeinträchtigung der Immunfunktion.

Im Gegensatz hierzu war bei akkumulierten neutrophilen Granulozyten das Überleben durch eine reduzierte Apoptoserate prolongiert (MATUTE-BELLO, 1997; PARSEY, 1999; FETEROWSKI, 2001; TANEJA, 2004). Die gesteigerte Neutrophilenaktivierung ist mit einer augmentierten *respiratory-burst*-Aktivität vergesellschaftet. Frei werdende Transmitter, unter anderen sFasL, verursachen schwere Gewebsschäden in Leber (HO, 1996), Niere (HEINZELMANN, 1999), Lunge (SERRAO, 2001) und Darm (KUBES, 1992). Im Lungenparenchym liberiertes sFasL kann in Alveolarepithelien, die unter septischen Bedingungen zudem vermehrt Fas-Rezeptor exprimieren (ALBERTINE, 2001), Apoptose induzieren (MATUTE-BELLO, 1999).

Während die Dysregulation der Immunantwort durch Veränderungen der Apoptose im Rahmen der Sepsis als ein wesentlicher Pathomechanismus anerkannt ist (MARSIK, 2003), wird die Bedeutung des programmierten Zelltodes für das Versagen solider Organe weiterhin kontrovers diskutiert (OBERHOLZER, 2001; DE FREITAS, 2004).

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Apoptose selbst im Zusammenhang mit einem so schwerem generalisiertem Krankheitsbild wie der Sepsis einer strengen Regulation unterworfen zu sein scheint. Eine Sepsis mit leichter und moderater Krankheitsschwere führt demnach nicht zur Initiierung der Apoptosekaskade gemessen anhand des CK-18-Neoepitops (M30) (Abbildung 13).

6.2.3 Schwerste Sepsis führt zu Apoptose von Hepatozyten

Die exemplarische Korrelation der Apoptosekaskade mit dem Ausmaß der Leberdysfunktion zeigte ebenfalls eine erhöhte Generierung von CK-18-Neoepitop nur bei schwerem Leberversagen, dann allerdings in hohen Konzentrationen (Abbildung 13). Abbildung 13 stellt im Unterschied zu Abbildung 38 die Patienten mit Leberversagen dar, bei denen aufgrund einer massiven Einschränkung der Detoxifikationsleistung der Leber die Indikation zum extrakorporalen Leberersatzverfahren, gestellt wurde. Die Einteilung des Leberversagens anhand des SOFA-**Subscores** Leber hingegen bezieht sich alleinig auf die Höhe des Bilirubinspiegels, einen späten und wenig sensitiven Marker der Organdysfunktion (HAWKER, 1991). Die Ergebnisse zeigen, dass Patienten im fulminantem Leberversagen bis 10fach höhere M30-Werte als diejenigen mit alleiniger Bilirubinerhöhung hatten (Abbildung 13 und 38).

Verschiedene Untersuchungen hatten dargestellt, dass Einschränkungen der Exkretionsleistung mit 19-22% häufig und frühzeitig auftreten (BAKKER, 2004), während die Inzidenz des Leberversagens, dass nur anhand des Bilirubinspiegels definiert wird, mit 1-3 % relativ niedrig geschätzt wird (WANG, 1991; ANGUS, 2001; KIMURA, 2001). Für die Prognose ist die Integrität der Leberfunktion entscheidend (SIEGEL, 1993; MARZI, 1994; RENSING, 2001; LEVY, 2005). So korreliert die Einschränkung der Exkretionsleistung gemessen anhand der Elimination von Indozyaningrün mit der Letalität (SAKKA, 2002; KORTGEN, 2009).

Durch die exemplarische immunhistochemische Untersuchung des Lebergewebes von 3 Patienten mit fulminantem septischen Leberversagen und hohen M30-Serumspiegeln konnten die Ergebnisse untermauert werden (Abbildung 40).

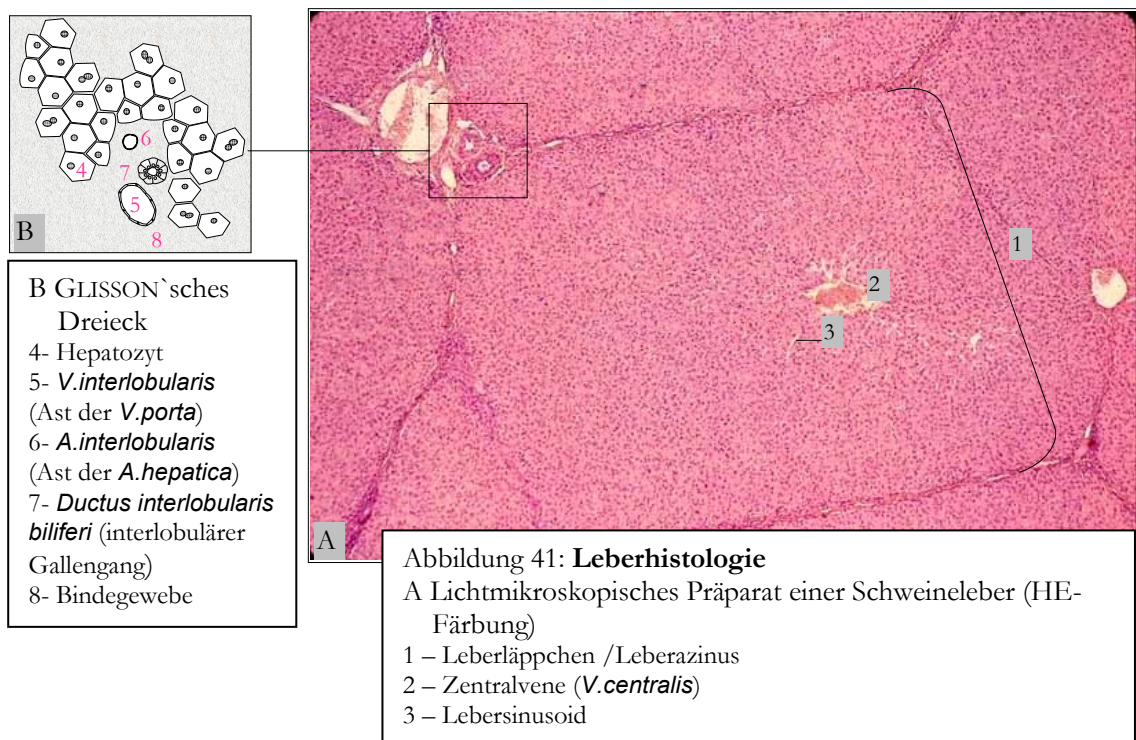
Bei Gesunden lässt sich weder M30 noch aktivierte Caspase 3, als Hinweis auf Aktivierung der Apoptosekaskade nachweisen. Die Biopate enthielten jedoch beide Marker in erhöhter Konzentration (Abbildung 40). Hierbei gab es Auffälligkeiten in der regionalen Expressionsdichte. Während M30 hauptsächlich perivenös lokalisiert war, wurde aktivierte Caspase 3 perivenös und in der mittleren Region des Leberläppchens exprimiert.

Verdeutlicht man sich den anatomischen Aufbau des Leberläppchens mit zentripetal gerichteter dualer Blutversorgung aus Ästen der *A.hepatica* und der *V.porta*, die gemeinsam in die Lebersinusoide und schließlich in die Zentralvene einmünden (Abbildung 41), wird

deutlich, dass es sich bei der perivenösen Region um die „letzte Wiese“ des Leberacinus handelt, d.h. um eine Region, in der Sauerstoff- und Nährstoffgehalt bereits unter physiologischen Bedingungen gemindert ist.

In Situationen mit kritischer Kreislagsituation, regionalen Perfusions- und Distributionsstörungen, wie sie bei Sepsis durch Zytokine ausgelöst werden, kann es somit zu einer kritischen Versorgung der Hepatozyten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Leberläppchen kommen.

Die Sauerstoffversorgung ist dann mit zunehmender Nähe zur Zentralvene eingeschränkt.



Teilt man, wie in Abbildung 42 gezeigt, den Leberacinus in 3 Versorgungszonen ein, so weist die äußere Zone A einen hohen Sauerstoffpartialdruck auf, während in Zone C der geringste Sauerstoffpartialdruck messbar ist. Aktivierte Caspase 3 fand sich in Zone B und C, ein Hinweis, dass hier die Apoptosekaskade bereits initiiert wurde. In Zone C, die zeitlich aufgrund ihrer eingeschränkteren Versorgungslage vermutlich eher betroffen war, zeigt sich bereits eine M30-Expression, die zwar als früher Apoptosemarker gilt, zeitlich jedoch erst nach der Caspasenaktivierung eintritt.

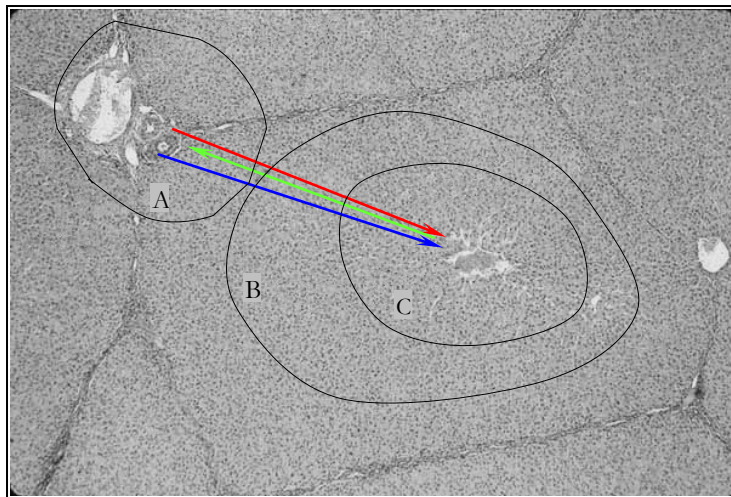


Abbildung 42: **Durchblutung der Leber mit Zonen der Sauerstoffversorgung**

- Blut der *A.hepatica*
- Blut der *V.portae*
- Galle

- A- Zone mit hohem Sauerstoffpartialdruck
- B- Zone mit mittlerem Sauerstoffpartialdruck
- C- Zone mit geringem Sauerstoffpartialdruck

In einem graduellen Ischämie-Reperfusions-Modell an Ratten konnten PAXIAN *et al.* ähnliche M30-Expressionsmuster in der Leber nachweisen (PAXIAN, 2003). Grundlage des Experimentes war eine Mangelversorgung des Gewebes im hämorrhagischen Schock, die zur ATP-Depletion führte. Im Rahmen des septischen Leberversagens werden ebenfalls Distributions- und Verteilungsstörungen als wesentlicher pathogenetischer Faktor diskutiert (TITHERADGE, 1999; RENSING, 2002). Einen besonders hohen Stellenwert nimmt die Translokation von Bakterien und Toxinen aus dem Darm ein (KRUEGER, 2002; WOODCOCK, 2000). Über die Pfortader passieren sie zunächst das Stromgebiet der Leber, wo sie von KUPFFER-Zellen, den ortständigen Makrophagen der Leber, phagozytiert werden. In Antwort auf diesen Stimulus sezernieren diese Zytokine, wie IL-6. Für die hepatozelluläre Dysfunktion im Zuge der Sepsis wird eine übersteigerte Zytokinantwort der KUPFFER-Zellen verantwortlich gemacht (BAUER, 1996; CURRIN, 1996; BROWN, 1997; KOO, 1999; HUYNH, 2000; YANG, 2000). KUPFFER-Zellen synthetisieren auch ET-1, das im Stromgebiet der Leber die eingangs beschriebenen Mikrozirkulationsstörungen auslösen soll (PAXIAN, 2004). Die resultierende Hypoxie bedingt eine Depletion energiereicher Phosphate, deren Ausmaß darüber entscheidet, ob die Zelle sich erholt oder durch Nekrose oder Apoptose zugrunde geht (PAXIAN, 2003).

6.2.4 Die Hepatozytenapoptose wird wahrscheinlich auf intrinsischem Weg initiiert

Die Bildung des CK-18-Neopeptids bei schwerem Leberversagen war in der vorliegenden Untersuchung von einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom c begleitet (Abbildung 13). Sowohl Gesunde als auch Septiker und SIRS-Patienten wiesen Cytochrom c-Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 ng/ml auf. Bei stark eingeschränkter Leberfunktion

im Rahmen eines septischen Leberversagens kam es zu einem steilen Anstieg der Werte auf durchschnittlich 2,07 ng/ml (maximal: 8,3 ng/ml minimal: 0,2 ng/ml, Median: 1,2 ng/ml). Dem gegenüber waren die sFasL-Serumkonzentrationen nahezu unverändert (Abbildung 13). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einem Apoptose-bedingten hepatozellulären Schaden, welcher über die intrinsische/mitochondriale Wegstrecke initiiert wird.

Eine sekundäre Involvierung der Mitochondrien ist jedoch mit den angewandten Untersuchungen nicht gänzlich auszuschließen. Laut aktueller Studienlage differieren verschiedene Zellpopulationen in Bezug auf die sekundäre Einbeziehung der Mitochondrien nach Ligation von FasL (SCAFFIDI, 1998). Allerdings gibt es bislang keine Studie, die klärt ob Hepatozytenapoptose, die über FasL-Bindung ausgelöst wird, zu einer Freisetzung von Cytochrom c führt. Möglicherweise könnte auch der lysosomale, der ER-vermittelte oder der Rezeptor-vermittelte Weg Auslöser des PCD sein. Gegen den Rezeptor-vermittelten Signalweg sprechen die niedrigen sFasL –Serumspiegel, die noch unter denen der gesunden Kontrollgruppe liegen (Abbildung 13 Grafik 2). Aufgrund der geringen Fallzahl von nur 3 Leberbiopaten kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass FasL-Rezeptoren an Leukozytenoberflächen, die angelockt durch Zytokine das Lebergewebe infiltrieren, die Apoptose induzieren. Ein solcher Mechanismus wurde von KLINTMANN und DOUGHTY beschrieben. In den 3 untersuchten Biopaten fanden sich mikroskopisch jedoch keine Hinweise auf Leukozyteninfiltration. KLINTMANN schlussfolgert, dass der auslösende Apoptosemechanismus (intrinsisch oder extrinsisch) in Abhängigkeit von dem die Sepsis verursachendem Erreger differiert (DOUGHTY, 2002; KLINTMANN, 2004). Bei den hier untersuchten Patienten waren sowohl gramnegative als auch grampositive Keime im Erregerspektrum der Sepsis erhalten. Eine Differenzierung bezüglich der unterschiedlichen Erreger und des Apoptosemechanismus erfolgte bislang nicht. DOUGHTY *et al.* hingegen schreiben den apoptotischen Untergang von Hepatozyten bei Sepsis dem Fas/FasL-System zu, was in Kontroverse zu den vorliegenden Ergebnissen steht. Die Arbeitsgruppe hatte jedoch für die betroffenen Patienten hohe sFasL-Spiegel gemessen. Der intrinsische Weg wurde in dieser Arbeit nicht untersucht (DOUGHTY, 2002). Bei den Patienten handelte es sich ferner ausschließlich um Kinder, was die Vergleichbarkeit einschränkt. Zudem beweisen hohe sFasL-Spiegel alleine nicht, dass die Apoptose der Hepatozyten auch durch diese ausgelöst wird. Hierzu muss die Zelle als weitere Bedingung auch empfänglich gegenüber sFasL sein, beispielsweise durch Expression von Fas-Rezeptor und Verfügbarkeit der zellinternen Signalproteine.

6.2.5 Veränderung der sTRAIL-Expression beim septischen Multiorganversagen

Als Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie mit hohen Homologieanteilen zu den Namensgebern der Familie, deren Beteiligung im Leberversagen bereits nachgewiesen ist, zielten unsere Untersuchungen auf spezifische Änderungen der Expression von TRAIL.

Im Bereich intensivmedizinischer Krankheitsbilder, speziell der Sepsis und ihr verwandten Erkrankungen, ist über TRAIL und seine Rezeptoren bislang wenig bekannt.

TRAIL ist in membranständiger und in seiner löslichen Form für die Beseitigung seneszenten Neutrophiler verantwortlich (TECCIO, 2004; LUM, 2005). Verlängertes Überleben neutrophiler Granulozyten stellt einen wichtigen pathogenetischen Faktor des MOV dar. Reife Neutrophile und Monozyten sind in der Lage sTRAIL freizusetzen und Apoptose in sensitiven Zellen auszulösen (TECCIO, 2004). Die Relevanz dieses Vorgangs beim kritisch kranken Patienten steht noch zur Frage, denn die Mehrzahl nativer humaner Zellen ist nicht empfänglich gegenüber TRAIL-induziertem Zelltod. Untersucht wurden insbesondere auch Zellen der Organe, die im Zuge eines MOV betroffen sind: Lungenfibroblasten, Kolonepithelien, glatte Muskelzellen und Hepatozyten (JO, 2000; YUROVSKY, 2003; SECCHIERO, 2004; RIMONDI, 2005).

In der vorliegenden Untersuchung waren die sTRAIL-Serumspiegel bei kritisch Kranken (SIRS- und Sepsis-Patienten) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Abbildung 14). In der Gruppe Sepsis-Kranker war darüber hinaus eine weitere Abnahme mit zunehmender Organdysfunktion zu verzeichnen, ohne dass dieses Ergebnis statistische Signifikanz erreichte. Auch eine Korrelation zu einem bestimmten Organsystem war, bis auf eine weitere leichte Abnahme bei zunehmend eingeschränkter Nierenfunktion (Abbildung 30), nicht ersichtlich (Abbildungen 28-33).

Die Abnahme des Serumspiegels könnte auf verminderter Expression als auch auf einen Verbrauch von sTRAIL hindeuten. Ein möglicher Mechanismus ist der Verbrauch des TRAILs an den Scheinrezeptoren TRAIL-R3, TRAIL-R4 oder Osteoprotegrin (OPG), die wie eingangs beschrieben, TRAIL-neutralisierend wirksam sind. OPG wird von Endothelzellen in Antwort auf inflammatorische Zytokine (IL-1 β und TNF- α) in deutlich höherem Maße exprimiert (COLLIN-OSDOBY, 2001). Bei den untersuchten Patienten mit infektiöser und nicht infektiöser systemischer Entzündung sind hohe Zytokin- und folglich auch hohe OPG- Spiegel zu erwarten. Demnach könnte TRAIL sich der Messung durch Bindung an OPG entziehen.

Die apoptogene Eigenschaft von sTRAIL hängt jedoch auch vom Expressionsmuster der Apoptose-transduzierenden Rezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R2 als auch von

intrazellulären Regulationsmechanismen ab (LUM, 2005; LEVERKUS 2000; KRAMMER, 2000). Eine ergänzende Untersuchung des Lebergewebes auf Expressionsveränderungen dieser Rezeptoren bei Sepsis könnte den Sachverhalt konkretisieren, ist aber aufgrund der benötigten repräsentativen Probenzahl ethisch kaum vertretbar.

Im Zusammenhang mit der Granulozytenapoptose könnten die erniedrigten Spiegel die Überlebenszeit seneszenten Neutrophiler verlängern und die damit verbundene *respiratory-burst*-Aktivität konsekutive Organschäden verursachen (MATUTE-BELLO, 1997; FETEROWSKI, 2001, TANEJA, 2004). Für die Lungenfunktion im MOV ist ein solcher Mechanismus nachgewiesen (WARE, 2000; SERRAO, 2001). Ein eindeutiger Zusammenhang mit der respiratorischen Insuffizienz lässt sich in den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht erkennen (Abbildung 29), vielmehr zeigten kritisch Kranke, d.h. sowohl SIRS- als auch Sepsispatienten generell erniedrigte sTRAIL-Spiegel (Abbildung 13, 28-32).

6.2.6 Veränderung der sFas/sFasL-Expression beim septischen Multiorganversagen

Das Fas/FasL-System gilt als einer der Hauptwege zur Induktion der Apoptose in aktivierten Immunzellen (MOUNTZ et al., 1995). Fas, ein Typ I-Transmembranprotein der TNF-Rezeptorfamilie wird in vielen Geweben konstitutiv und nach Aktivierung exprimiert (NAGATA & GOLDSTEIN, 1995).

Eine Studie an Kindern mit Sepsis-induziertem MODS demonstrierte, dass das antiapoptotische sFas das Überleben aktivierter Immunzellen verlängert und mit einem schlechten *Outcome* der Patienten in Verbindung steht (DOUGHTY, 2002). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen hohe sFas-Werte bei Septikern, die das Signifikanzniveau ab SOFA 8-14 erreichen (Abbildung 14).

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnte bei DOUGHTY ein Zusammenhang zwischen hohen sFasL-Spiegeln und einer Schädigung von Lebergewebe auf dem Boden einer Lymphozyteninvasion dargestellt werden (DOUGHTY, 2002). Die verfügbaren Studien zur Expression Apoptose-assoziiierter Proteine in diesem Zusammenhang liefern ebenfalls kontroverse Ergebnisse (PAPATHANASSOGLU, 2000; DOUGHTY, 2002; DeFREITAS, 2004). Diese Arbeiten werden durch niedrige Patientenzahlen und eine beschränkte Auswahl an Apoptosemarkern limitiert.

Patienten, die an Sepsis erkrankt waren, zeigten gegenüber Gesunden und SIRS-Patienten erhöhte sFas-Werte (Abbildung 13), die mit dem Schweregrad der Organdysfunktion korrelierten. Insbesondere im Verlauf verstorbene Patienten hatten wiederum höhere Werte als Überlebende (Abbildung 15), was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der

3 Forschungsgruppen ist (PAPATHANASSOGLU, 2000; DOUGHTY, 2002; DE FREITAS, 2004). Die sFas-Werte lagen im Verlauf hierbei etwa ab dem 3.Tag signifikant höher als die der Überlebenden (Abbildung 15).

In Abhängigkeit vom Schweregrad der Organdysfunktion konnten wir zudem einen Zusammenhang mit der Nieren- und Leberfunktion nachweisen (Abbildungen 13 und 18). So kommt es mit abnehmender Nierenfunktion zu einer Zunahme von sFas im Blut. Aus theoretischer Sicht könnte hierbei eine eingeschränkte renale Ausscheidung von sFas eine Rolle spielen. Tatsächlich korreliert die sFas-**Clearance** mit der Kreatinin-**Clearance** (BABA, 2004; DALBONI, 2008). Aber auch eine gesteigerte Synthese als Ursache der sFas-Erhöhung wird diskutiert (JABER, 2001; DALBONI, 2008).

Mit abnehmender Leberfunktion ist ebenfalls ein Anstieg an sFas zu verzeichnen. Dies wird durch den SOFA-**Subscore**-Leberfunktion (Abbildung 20) jedoch nur unzureichend widergespiegelt. Die geringe Aussagekraft dieses SOFA- **Subscores** resultiert aus der Tatsache, dass er die steigende Bilirubinkonzentration, also einen späten und für die akute Leberdysfunktion wenig sensitiven Parameter beinhaltet (HAWKER, 1991). Die höchsten sFas Werte wurden bei Patienten erfasst, deren fulminantes Leberversagen ein Organersatzverfahren notwendig machte (Abbildung 13). Diese Patienten wurden nach klinischem Bild und einer Einschränkung der Plasmaverschwinderate von Indocyaningrün diesem Organersatzverfahren zugeführt.

Das 26 kDa schwere Protein sFas könnte neben der renalen Elimination auch einem hepatozellulären Abbau unterliegen und mit abnehmender Leberleistung akkumulieren. In der Literatur lassen sich hierzu jedoch keine Hinweise finden. Um diese These zu erhärten, wären Untersuchungen zur Aufnahme und zum Abbau von sFas durch Hepatozyten notwendig. Beispielweise wäre ein Zellkulturexperiment mit Fluoreszenzfarbstoffmarkiertem sFas denkbar. Hierbei ließe sich auch der Einfluss von Zytokinen, wie sie beispielsweise bei Sepsis frei werden, prüfen.

Die gesteigerte Synthese von sFas bei Sepsis in Abhängigkeit vom Schweregrad der Organdysfunktion könnte im Sinne einer antiapoptotischen Funktion der Organprotektion dienen – möglicherweise als Versuch des Organismus sich vor einem weiteren Zellverlust bei ohnehin kritischer Organfunktion zu schützen (Abbildung 14). Eine Protektion der Endorgane bei leichter/moderater Sepsis lässt sich, wie bereits erläutert, aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung insofern ableiten, dass es zur Apoptose erst beim Endorganversagen kommt (Abbildung 13).

sFasL hingegen scheint im Falle eines SIRS/einer Sepsis gegenüber der gesunden Kontrollgruppe reduziert zu sein (Abbildung 14). Zwischen Sepsis und SIRS waren hierbei keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Auch der zeitliche Verlauf lieferte inkonstante Ergebnisse mit der Tendenz zu den niedrigsten sFasL-Spiegeln bei versterbenden Septikern mit MODS (Abbildung 15). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von NAKAE steht aber in Kontroverse zu den Untersuchungen von DOUGHTY *et al.*. Diese Forschungsgruppe wies bei Patienten mit septischem MODS hohe sFasL-Werte nach. Durch histologische Untersuchung des Lebergewebes wiesen sie zudem nach, dass es bei hohen sFasL-Serum-Spiegeln zu einer lymphozytären Infiltration des Lebergewebes mit konsekutiver Schädigung der Hepatozyten bis hin zur massiven Leberdestruktion kam (NAKAE, 2001; DOUGHTY, 2002).

Da sFasL durch Matrix-Metalloproteinasen im Rahmen viraler Infektion von der Zelloberfläche freigesetzt wird (KAYAGAKI, 1995; POWELL, 1999), könnte auch die Genese der Sepsis – viral oder bakteriell – Einfluss auf den sFasL-Spiegel nehmen. Andererseits kann sich sFasL der Nachweisbarkeit auch durch Bindung an Fas-Rezeptoren und Internalisierung oder durch Bindung an sFas der Nachweisbarkeit entziehen. Hiergegen spricht jedoch, dass durch das Erscheinen von Cytochrom c bei schwerem Leberversagen eher der mitochondriale Weg als Apoptose-Auslöser beschritten wird.

7. Schlussfolgerung

Vergleichende Autopsien an verstorbenen Intensivpatienten mit Sepsis und anderen Todesursachen zeigten extensive Apoptose von Lymphozyten und gastrointestinalem Epithel bei Patienten mit Sepsis, was den Schluss nahe legte, dass die Apoptose einen wichtigen Pathomechanismus dieser Erkrankung darstellt (HOTCHKISS, SWANSON, 1999a). Es folgten neben zahlreichen tierexperimentellen Studien auch Untersuchungen an Patienten, die Apoptose u.a. in Gefäßendothelien (ROTH, 2004b; ZHOU, 2004), Thymusgewebe (LE TULZO, 2002) und Lungenepithelien (KRAMMER, 2000a; HOTCHKISS, 2001b; DOSREIS, 2004; NAKAMURA, 2004) nachwiesen.

Die Frage des Beitrags der Apoptose am septischen Endorganversagen wurde jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (MARSIK *et al.*, 2003; DE FREITAS *et al.* 2004).

Ziel der vorliegenden Studie war die systematische Messung der Aktivierung der Apoptosekaskade an Patienten mit SIRS und Sepsis und die Korrelation der Ergebnisse mit dem Schweregrad der Erkrankung. Kenntnisse welche Signalwege im Detail in die Sepsis-verursachte Apoptose involviert sind, könnten die Entwicklung von gezielten Therapeutika erlauben.

Zusammenfassend lassen sich anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse drei Kernaussagen treffen:

1. Im Rahmen einer schweren Sepsis kommt es zum Auftreten einer epithelialen Apoptose, die anhand des Erscheinens von Zytokeratin-18-Neoepitop (M30) sowohl im Serum als auch im epithelialen Gewebe nachweisbar ist.
2. Die Apoptose ist selbst im Zusammenhang mit einer Sepsis ein streng regulierter Prozess. Leichte und moderate Sepsis führen demnach nicht zum Anlaufen der Apoptosekaskade.
3. Erst bei schwerstem Krankheitsbild kommt es zum programmierten Zelltod epithelialer Organe, wie der Leber. Die Apoptose wird dann über den intrinsischen/ mitochondrialen Weg eingeleitet, was sich über den Nachweis von Cytochrom c bei gleichzeitigem Fehlen von sFasL bekräftigen lässt. Dem Zellverlust folgt eine eingeschränkte Organfunktion bis hin zum Leberversagen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind also vereinbar mit einem Apoptose-bedingten hepatozellulären Schaden, der über die intrinsische/mitochondriale Wegstrecke initiiert

wird, und deuten zudem auf eine mögliche Protektion von Organen gegenüber dem apoptotischen Zelltod bei geringer und moderater Organdysfunktion hin, wohingegen der programmierte Zelltod einen wesentlichen Beitrag zum schweren Organversagen (z.B. der Leber) zu leisten scheint.

Ein ausgeprägter Zellverlust durch Apoptose oder durch Nekrose führt konsekutiv zu einer geminderten Organfunktion. Das Ausmaß ist in Hinsicht auf die Kompensierbarkeit des Funktionsausfalles eines Organs jedoch von größter Bedeutung, da sich hieraus therapeutische Strategien ableiten lassen, die die Prognose des Patienten maßgeblich beeinflussen können. Bei diesen schwer betroffenen Patienten ist der Zeitfaktor oft entscheidend hinsichtlich der Prognose. Für die Leber, deren Funktion in der Praxis üblicherweise anhand des Bilirubinspiegels gemessen wird, könnte hierbei wichtige Zeit verloren gehen, denn der Bilirubinanstieg gilt als später Marker der Organdysfunktion und ist wenig sensitiv (HAWKER, 1991). Die Möglichkeit, anhand eines einfach zu bestimmenden Blutparameters, wie M30, die Tragweite Sepsis-induzierter Apoptose und die Prognose kritisch Kranker hinsichtlich Überleben und Organfunktion frühzeitig abzuschätzen, war daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Der M30-Serumspiegels scheint ein effektives, wenig invasives und mit einem geringen Kostenaufwand verbundenes Werkzeug zu sein, um das Ausmaß des Organversagens, insbesondere des Leberversagens bei septischen Patienten zu quantifizieren. Die klinische Konsequenz könnte ein früherer Einsatz von Leberersatzverfahren sein. Die Leberzellfunktion unterstützende Medikamente könnten gezielter eingesetzt werden. Auch der Erfolg therapeutischer Interventionen, wie beispielsweise der Einsatz von Caspaseinhibitoren, ließe sich eventuell über die Messung von M30 monitoren. Hierfür wären jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend eignet sich die Bestimmung der Serumkonzentration Apoptose-spezifischer Proteine zur indirekten Quantifizierung der Apoptoseaktivität bei Patienten mit SIRS und Sepsis und könnte hilfreich zur Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität sein sowie neue Einblicke in die Bedeutung der Apoptose bei der Pathogenese und dem Therapieverlauf ermöglichen.

10. Literaturverzeichnis

A

ALBERTINE KH, SOULIER MF, WANG Z, ISHIZAKA A, HASHIMOTO S, ZIMMERMAN GA, MATTHAY MA, WARE LB. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* **2002**;161:1783–1796.

ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT G, CARCILLO J, PINSKY MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303–1310

ANTONSSON B. & MARTINOU JC. The Bcl-2 protein family. *Exp cell Res.* 256, 50-57 (2000)

ASHKENAZI A: Targeting death ad decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430, **2002**

AYALA A, HERDON CD, LEHMAN DL, AYALA CA, CHAUDRY IH (1996) Differential induction of apoptosis in lymphoid tissue during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 87:4261-4275

AYALA A, EVANS TA, CHAUDRY IH (1998) Does hepatocellular injury in sepsis involve apoptosis? *J Surg res* 76; 165-173

AYALA A, XU YX, CHUNG CS, CHAUDRY IH. (1999) Does Fas ligand or endotoxin contribute to thymic apoptosis during polymicrobial sepsis? *Shock* **11**, 211–217.

AYALA, A., LOMAS, J. L., GRUTKOSKI, P. S., CHUNG, C. S. (2003) Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 7–15.

B

BABA K, MINATOGUCHI S, SANO H et al.: Involvement of apoptosis in patients with diabetic nephropathy. *Nephrology*, Vol 9 Issue 2, 94-99, **2004**

BAETU TM, HISCOTT J. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* **2002**; 13, 1999-207

BAKKER J, GROVER R, McLUCKY A, HOLZAPFEL L, ANDERSON J, LODATO R, WATSON D, GROSSMAN S, DONALDSON J, TAKALA J. Administratio of the nitric oxide synthase inhibitor NG-Methyl L arginine hydrochloride (546C88) by intraveous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized double blind placebo controlled multicenter study. *Crit Care Med* **2004**; 32: 1-12

BARTON BE (1997) IL-6: Insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 85: 16-20

BASSIK MC, SCORRANO L, OAKES SA, POZZAN T, KORSMEYER SJ (2004) Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 23: 1207–1216

BATEMAN RM, SHARPE MD, ELLIS CG (2003) Bench-to-bedside review: microcircular dysfunction in sepsishemodynamics, oxygentransport, and nitric oxide. *Crit Care Med* 7(5):359-373

- BAUER M (1996) Pathophysiologie der Sepsis. Aktuelle Konzepte. *Anaesthesist* 45:312–322
- BAUER M (1997) Stickstoffmonoxid. *Anaesthesist* 46:441–450
- BAUER M et al. Transcriptomic and proteomic patterns of systemic inflammation in on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting, **2005**
- BAUER M, BRUNKHORST F, WELTE T, GERLACH H, REINHART K: Sepsis-Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie, *Anaesthesist* **2006**, 55:835–845
- BECK JM, PRESTON AM, WILCOXEN SE, MORRIS SB, WHITE ES, PAINE III R. (2003) Pneumocystis pneumonia increases the susceptibility of mice to sublethal hyperoxia. *Infect. Immun.* 71, 5970–5978.
- BEN ABRAHAM R, SZOLD O, MERHAV H et al. (2001) Rapid resolution of brain edema and improved cerebral perfusion pressure following the molecular adsorbed recycling system in acute liver failure. *Transplant Proc* 33:2897-2899
- BEN-ARI Z, SCHMILOVOTZ-WEISS H, BELINKI A, et al. Circulating soluble cytochrome c in liver disease as a marker of apoptosis. *J Intern Med* **2003**;254:168– 75
- BENNETT M, MACDONALD K, CHAN SW, LUZIO JP, SIMARI R, WEISSBERG P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **1998**; 282:290-3
- BERGHE G van den, WOUTERS P, WEEKERS F et al. (2001) Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 345 (19): 1359-1367
- BERNARD GR, VINCENT JL, LATERRE PF, LAROSA SP, DHAINAUT JF, LOPEZ-RODRIGUEZ A, STEINGRUB JS, GARBER GE, HELTERBRAND JD, ELY EW, FISHER CJ Jr (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344(10):699-709
- BIDERE N, LORENZO HK, CARMONA S, LAFORGE M, HARPER F, DUMONT C, SENIK A (2003) cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing-factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* 278:31401
- BOCHUD PY, CALANDRA T (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 326 (7383): 262-266
- BONE 1992 „European Society of Intensive Care Medicine” Sepsisdefinitionen
- BONE RC (1996) Sir Isaak Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 24: 1125-1128
- BORGERSON KL, BRETZ JD, BAKER JR jr. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity.* 30(4):251-64, **1999**
- BOYA P et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 197, 1323-1334 (2003)
- BRECKENRIDGE DG, NGUYEN M, KUPPING S, RETH M, SHORE GC (2002) The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4331-4336

BROWN AP, HARKEMA JR, SCHULTZE AE, ROTH RA, GANEY PE. Gadolinium chloride pretreatment protects against hepatic injury but predisposes the lungs to alveolitis after lipopolysaccharide administration. *Shock*. **1997**;7:186–192.

BRUN-BOISSON C, DOYON F, CARLET J. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: a multicenter prospective study in intensive care units. *JAMA* **1995**; 274:968-974

BRUN-BUISSON et al. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 154: 617-24

BRUN-BOISSON C, ROUDOT-THORAVALL F, GIROU E et al. The cost of sepsis syndromes in the intensive care unit and influence of hospital acquired sepsis. *Intensive Care Med* 29: 1464-1471, **2003**

BRUN-BUISSON C, MESHAKA P, PINTON P, VALLET B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in french intensive care units. *Intensive Care Med* **2004**; 30: 580-588

BRUNKHORST FM, ENGEL C, BONE HG, BRUNHORST R, GERLACH H, GROND S, GRUENDLING M, HUHLE H, JASCHINSKI U, JOHN S, MAYER K, OPPERT M, OLTHOFF D, QUINTEL M, RAGALLER R, ROSSAINT R, STUEBER F, WEILER N, WELTE T, LÖFFLER M, REINHART K, and the German Competence Network Sepsis (SepNet) (**2005**) Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany-Results from the German Prevalence Study. *Infection* 33 (Suppl 1): 49

BRUNK UT, NEUZIL J & EATON JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep* 6, 91-97 (**2001**)

C

CAIN K, BRATTON SB, LANGLAIS C, WALKER G, BROWN DG, SUN XM. (**2000**). *J Biol Chem* 275: 6067–6070.

CAIN K et al. (**2002**) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84: 203–214

CAULIN C, SALVESEN GS, OSHIMA RG: Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138:1379–1394, **1997**.

CHENG J, ZHOU T, LIU C, SHAPIRO JP, BRAUER MJ, KIEFER MC, BARR PJ, MOUNTZ JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 263(5154):1759-62, **1994** Mar 25.

CHIU PM, NGAN YS, KHOO US, CHEUNG AN: Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* 38:243-249, **2001**

CHUNG S, WANG W, CHAUDRY IH, AYALA A. (**2001a**) Increased apoptosis in lamina propria B cells during polymicrobial sepsis is FasL but not endotoxin mediated. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G812–G818

CHUNG CS, YANG S, SONG GY, et al. Inhibition of the Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow during sepsis. *Surgery* **2001b**: 130;339-345

CHUNG CS, SONG GY, LOMAS J, SIMMS HH, CHAUDRY IH, AYALA A (2003) Inhibition of Fas/FasLigand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* 74, 344-351

CLANCY L, MRUK K, ARCHER K, WOELFEL M, MONGKOLSAPAYA J, SCREATON G, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18099-104

COBB JP, BUCHMAN TG, CHANG K, QUI Y, LAUBACH VE, HOTCHKISS RS. (1999) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery* 126, 438-442.

COBB JB, BUCHMAN TG, KARL IE, HOTCHKISS RS (2000) Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaption, and apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)* 1(3):207-215

COLLIN-OSDOBY P, ROTHE L, ANDERSON F, NELSON M, MALONEY W, OSDOBY P. Receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-72.

COOPERSMITH CM, CHANG KC, SWANSON PE et al. (2002) Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med* 30:195-201

CORY S & ADAMSJM. (2002). *Nat Rev Cancer* 2: 647-656.

CREASEY AA, REINHART K (2001) Tissue factor pathway inhibitor activity in severe sepsis. *Crit Care Med* 29 [Suppl7]: S126-129

D

DALBONI MA, CENEDEZ MA, MANFREDI SR et al: High serum levels of sfas in ckd-patients: effekt of renal clearance, reabsorption and synthesis. *It J Artif Organs*. 2008, 31(5); 405-10

DANIAL NN & KORSMEYER S. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219 (2004)

DAUGAS E, NOCHY D, RAVAGNAN L, LOEFFLER M, SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476:118-123

DE FREITAS I, FERNANDEZ-SOMOZA M, ESSENFELD-SEKLER E, CARDIER JE. Serum levels of apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor- α /tumor necrosis factor type-I receptor and Fas/FasL, in sepsis. *Chest*. 125(6): 2238-46, 2004 Jun

DEGLI-ESPOSTI MA. DOUGALL WC. SMOLAK PJ. WAUGH JY. SMITH CA. GOODWIN RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. [Journal Article] *Immunity*. 7(6):813-20, 1997

DEGLI-ESPOSTI M, FERRY G, MASDEHORS P, BOUTIN JA, HICKMAN JA, DIVE C. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 2003; 278:15749-57.

DEUTSCHE SEPSIS-GESELLSCHAFT Internet 2005

DOSREIS GA, BORGES VM, ZIN WA. (2004) The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J. Cell. Mol. Med*. 8, 285-293.

DOUGHTY L, CLARK RSB, KAPLAN SS, SASSER H, CARCILLO J: sFas and sFasL and pediatric sepsis-induced Multiple Organ Failure Syndrome. *Pediatr Resear* Vol 52 922-927, **2002**

E

EMERY JG. MCDONNELL P. BURKE MB. DEEN KC. LYN S. SILVERMAN C. DUL E. APPELBAUM ER. EICHMAN C. DIPRINZIO R. DODDS RA. JAMES IE. ROSENBERG M. LEE JC. YOUNG PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL *Journal of Biological Chemistry*. 273(23):14363-7, **1998**

ESMON CT (**2004**) Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 47(4): 305-314

EVAN GI,VOUSDEN KH (**2001**) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.*Nature* 411:342–348

F

FADOK VA. VOELKER DR. CAMPBELL PA. COHEN JJ. BRATTON DL. and HENSON PM. (**1992**) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148, 2207-16.

FEHRENBACHER N, GYRD-HANSEN M, POULSEN B, FELBOR U, KALLUNKI T, BOES M, WEBER E, LEIST M, JAATELLA M (**2004**) Sensitizationnt the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 64:5301

FERRI, K.F., and G.K. KROEMER. **2001**. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3:E255–E263.

FETEROWSKI C, WEIHARDT H, EMMANUILIDIS K, et al: Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol* **2001**; 31:1268-1277

FINK MP (**2001**) Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 17: 219 –237

G

GAUT JR, HENDERSHOT LM (**1993**) The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 5: 589–595

GREEN DR. & G KROEMER. **2004**. The Pathophysiology of mitochondrial cell death. [Review] *Science* Vol 305 626-629

GUO RF et al. Protective effects of anti-C5a in sepsis- induced apoptosis. *J.Clin.Invest.* 106, 1271-1280 (**2000**).

H

HÄCKER G, WEBER A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? Minireview, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462 (**2007**) 150–155

HAMADA E, NISHIDA T, UCHIYAMA Y. et al. Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J Heptol* 1999;30:807-818

- HAWKER F **(1991)** Liver dysfunction in critical illness. *Anaesth Intensive Care* 19:165-181
- HEINZELMANN M, MERCER-JONES MA, PASSMORE JC: Neutrophils and renal failure. *Am Kidney Dis* 1999; 34:384-399
- HIRAMATSU M, HOTCHKISS RS, KARL IE, BUCHMANN TG (1997) Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 7:247-253
- HO JS, BUCHWEITZ JP, ROTH RA, et al: Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes. *J Leukoc Biol* 1996; 59:716-724
- HOLLER N et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunol.* 1, 489-495 (2000).
- HOTCHKISS RS, SWANSON PE, FREEMAN BD, TINSLEY KW, COBB JP, MATUSCHAK GM, BUCHMAN TG, KARL IE: Apoptotic cell death in patients with sepsis, septic shock and multiple organ dysfunction. *Crit care Med* 27:1230-1251, **1999a**
- HOTCHKISS RS, TINSLEY KW, SWANSON PE et al. **(1999b)** prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14541-14546
- HOTCHKISS RS, SWANSON PE, KNUDSON CM et al **(1999c)** Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 162:4148-4156
- HOTCHKISS RS, SCHMIEG RE, SWANSON PE, FREEMAN BD, TINSLEY KW, COBB JP, BUCHMAN TG, KARL IE: Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and. *Crit care Med* 28:3207-3217, **(2000)**
- HOTCHKISS RS, TINSLEY KW, SWANSON PE, SCHMIE JR, HUI JJ, CHANG KC, OSBORNE DF, FREEMAN BD, COBB JP, BUCHMAN TG et al. **(2001a)** Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952
- HOTCHKISS RS, DUNNE WM, SWANSON PE, DAVIS CG, TINSLEY KW, CHANG KC, BUCHMAN TG, KARL IE. **(2001b)** Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Science* 294, 1783.
- HOTCHKISS RS, CHANG KC, GRAYSON MH, TINSLEY KW, DUNNE BS, DAVIS CG, OSBORNE DF, KARL IE. **(2003)** Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6724-6429.
- HUYNH TT, LEMASTERS JJ, BRACEY LW, BAKER CC. Proinflammatory Kupffer cell alterations after femur fracture trauma and sepsis in rats. *Shock*. **2000**;14:555–560.

I

Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen, HP SCHUSTER und K WERDAN (Herausgeber), 3.vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer Verlag

IWAI K, MIYAWAKI T, TAKIZAWA T, KONNO A, OHTA K, YACHIE A, SEKI H, TANIGUCHI N **1994** Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84:1201– 1208

J

JABER BL, PERIANAYAGAM MC, BALAKRISHNAN VS, KING AJ, PEREIRA BJG. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas/Fas ligand system. *J.Leukoc.Biol.* 69: 1006-1012 (**2001**)

JANSSEN EM, DROIN NM, LEMMENS EE, PINKOSKI MJ, BENSINGER SJ, EHST BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **2005**; 434:, 88-93

JAVADI P, BUCHMAN TG, STROMBERG PE, HUSAIN KD, DUNNE WM, WOOLSEY CA, TURNBULL IR, HOTCHKISS RS, KARL IE, COOPERSMITH CM. (**2004**) High-dose exogenous iron following cecal ligation and puncture increases mortality rate in mice and is associated with an increase in gut epithelial and splenic apoptosis. *Crit. Care Med.* 32, 1178–1185.

JIANG X & WANG X. Cytochrom C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 87-106 (**2004**)

JO M, KIM TH, SEOL DW, ESPLIN JE, DORKO K, BILLIAR TR, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* **2000**; 6:564–7.

K

KAPLAN MJ, RAY D, MO RR, YUNG RL, RICHARDSON BC. TRAIL (Apo2ligand) and TWEAK (Apo3ligand) mediate CD4+Tcell killing of antigen-presenting macrophages. *J Immunol* **2000**; 164: 2897-904

KAUFMANN SH & HENGARTNER MO. Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends Cell Biol.* II, 526-534 (**2001**)

KAYAGAKI N, KAWASAKI KN, OHMOTO ET et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* **1995**; 182: 1777-83.

KERR JF, HARMON B, SEARLE J. (**1974**) An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci*, 14, 571-85.

KIMURA S, YOSHIOKA T, SHIBUYA M, SAKANO T, TANAKA R, MATSUYAA S. Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. *Crit Care Med* **2001**; 29: 1159-63

KLINTMANN D, LI X. Staphylococcal Eterotoxin A-induced Hepatotoxicity is predominantly mediated by FasL. *Annals of surgery*, Volume 240, Number 6, 1065-1072, **2004**

KLINZING S, SIMON M, REINHART K et al. (**2003**) High-dose vasopressin is not superior to norepinephrine in septic shock. *Crit Care Maed* 31(11): 2646-2650

KOO DJ, CHAUDRY IH, WANG P. Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surg Res.* **1999**;83:151–157.

KOPITO RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524–530, (**2000**).

KORTGEN A, PAXIAN M, WERTH M, RECKNAGEL P, RAUCHFUSS F, LUPP A, KRENN CG, MÜLLER D, CLAUS RA, REINHART K, SETTMACHER U, BAUER M: Prospective assesment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. *Schock* **2009** 32(4), 358-65

KOZIEL H, KOZIEL MJ. Pulmonary Complications of diabetes mellitus: pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* **1995**;9:65-96

KRAMMER PH. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, 71, 163-210.

KRAMMER PH. CD 95's deathly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795 (**2000**)

KROEMER, G & REED JC. **2000**. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6:513–519.

KROEMER G & JÄÄTTTELÄ M. (**2005**) Lysosomes and Autophagy in cell dath control. Review article. *Nature* 5, 886-897

KROEMER G & MARTIN SJ. (**2005**) Caspaseindependent cell death. Review article. *Nature* 11, 725-729

KRUEGER WA, LENHART FP, NEESER G, RUCKDESCHEL G, SCHRECKHASE H, EISSNER HJ, FORST H, ECKHARD J, PETER K, UNERTL KE (**2002**) Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgery patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 166(8):1029-1037

KUBES P, HUNTER J, GRANGER DN, Ischemia/reperfusion induced feline intestinal dysfunction: Importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterology*, **1992**; 103:807-812

KUPFNER JG, ARCAROLI J, YUM HK, NADLER SG, ABRAHAM E. Role of NF-kB in endotoxemia induced alterations of lung neutrophil apoptosis. *J Immunol* **2001**; 167:7044–51.

L

LE BRAS M, ROUY I, BRENNER C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. [Review] [161 refs *Medicinal Chemistry*. 2(1):1-12, **2006** Jan.

LEERS MP, KOLGEN W, BJORKLUND V, BERGMANN T, TRIBBIC G, PERRSON B, BJORKLUND B, RAMAEKERS FC, BJORKLUND B, NAP M, JORNVAL H, SCHUTTE B: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratine 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 187, **1999**, 567,

LEIST M, JÄÄTTTELÄ M (**2001**) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589–598

LE TULZO Y, PANGAULT A, GACOUIN V, GUILLOUX O, TRIBUT L, AMIOT P, TATTEVIN R, THOMAS R, FAUCHET R, DRENOU. **2002** Early circulationg lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487

LEVERKUS M, WALCZAK H, MCLELLAN A, FRIES HW, TERBECK G, BROCKER EB, KAMPGEN E. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. [Journal Article] *Blood*. 96(7):2628-31, **2000** Oct 1.

LEVINE B & KLIONSKY DJ (2004) Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* 6, 463-477

LEVY MM, MACIAS WL, VINCENT JL, RUSSELL JA, SILVA E, TRZAKOMA B, WILLIAMS MD. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care med* 2005 33 (10):2194-201

LIABAKK NB, SUNDAN A, TORP S, AUKRUST P, FROLAND SS, ESPEVIK T. Development, characterisation and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA. *J Immunol Methods* 2002; 259:119-28

LICHTMAN S. Bacterial translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2001**;33:1-10

LI J, LEE B, LEE AS (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 281: 7260–7270

LI LY, LUO X & WANG X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99 (2001)

LI LZ, LI CJ, PINTO AV. Release of mitochondrial cytochrome c in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Mol Med* 5(4), 232-239 (1999)

LIVINGSTON DH, MOSENTHAL AC, DEITCH EA (1995) Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizons* 3: 257-266

LUM JJ, BREN G, McCLURE R, BADLEY AD. Elimination of senescent neutrophils by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol* **2005**; 175:1232-8

M

MARCHETTI O, BILLE J, FLUCKINGER U et al. (2004) Fungal infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in swiss tertiary care hospitals: secular trends 1991-2000. *Clin Infect Dis* 38:311-320

MARSIK C et al. Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas Ligand Expression in Leukocytes During Systemic Inflammation in Humans Volume 20(6), December **2003**, pp 493-496

MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S, MOSS M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;248:1546-54

MARTIN TR, HAGIMOTO N, NAKAMURA M, MATUTE-BELLO G. Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs. *Proc Am Thorac Soc* Vol 2. pp 214–220, **2005**

MARZI I (1994) Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 29:41-46

MATE MJ, ORTIZ-LOMBARDIA M, BOITEL B. et al (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* 9:442–446

MATUTE-BELLO G, LILES WC: Neutrophil apoptosis in acute respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Crit Care Med* **1997**; 156:1969-1977

MATUTE-BELLO G, LILES WC, STEINBERG KP, KIENER PA, MONGOVIN S, CHI EY, JONAS M, MARTIN TR. Soluble Fas-Ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol* **1999**; 163:2217–2225.

MATUTE-BELLO, G., WINN, R. K., JONAS, M., CHI, E. Y., MARTIN, T. R., LILES, W. C. (2001) Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo. *Am. J. Pathol.* **158**, 153–161.
 MCCLAIN K. Immunodeficiency secondary to infiltrative disease and malignancy. In: RICH RR, FLEISCHER TA, SCHWARTZ BD, et al. eds. *Clinical immunology: principles and practice*. St.Louis: Mosby, **1996**:586-590.

MCCULLOUGH KD, MARTINDALE JL, KLOTZ LO, AW TY, HOLBROOK NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**: 1249–1259

MEIER-HELLMANN A, REINHART K, BREDLE DL, et al: Epinephrine impairs splanchnic perfusion in septic shock. *Crit Care Med* **1997**; 25:3999-404

MEIER P, FINCH A, EVAN G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407:796–801

MEMBERS OF THE AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIAN/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE (1992) Members of the American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definition of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20: 864-87

MESSARIS E, MEMOS N, CHATZIGIANNI E, KATAKI A, NIKOLOPOULOU M, MANOURAS A, ALBANOPOULOS K, KONSTANDOULAKIS MM, BRAMIS J (2008): Apoptotic death of renal tubular cells in experimental sepsis. *Surg Infect* 9(3): 377-388

MITZNER SR, STANGE J, KLAMMT S, PESZYNSKI P, SCHMIDT R (2001) Albumin dialysis using the molecular adsorbent recirculating system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:777-783

N

NAGATA S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. [Review] [74 refs] [Journal Article. Review] *Advances in Immunology*. 57:129-44, **1994**

NAGATA S. GOLSTEIN P. The Fas death factor. [Review] [98 refs] [Journal Article. Review] *Science*. 267(5203):1449-56, **1995**

NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell* **1997**: 88:355-365

NAKAE H, NARITA K, ENDO S: Soluble Fas and soluble Fas ligand levels in patients with acute hepatic failure. *J Crit Care* **2001**, 16: 59-63

NAKAMURA M, MATUTE-BELLO G, LILES WC, HAYASHI S, KAJIKAWA O, LIN S-M, FREVERT CW, MARTIN TR. (2004) Differential response of human lung epithelial cells to Fas-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 164, 1949–1958.

NEVILLE-WEBBE HL, CROSS NA, EATON CL, NYAMBO R, EVANS CA, COLEMAN RE, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* **2004**; 86:269-79

O

OBERHOLZER A, OBERHOLZER C, MINTER RM, MOLDAWER LL (2001) Considering immunomodulatory therapies in the septic patient: should apoptosis be a potential therapeutic target? *Immunol Lett* 75:221-224

OGASAWARA J, WATANABE-FUKUNAGA R, ADACHI M, MATSUZAWA A, KASUGAI T, KITAMURA Y, ITOH N, SUDA T, NAGATA S **1993** Lethal effect of the anti-fas antibody in mice. *Nature* 364:806–809

OSHIMI Y, ODA S, HONDA Y, et al. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* **1996**; 157:2909-2915

OTTONELLO L, TORTOLINA G, AMELOTTI M, DALLEGRI F. Soluble Fas Ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* **1999**; 162: 3601-6

OYADOMARI S, MORI M (**2004**) Role of CHOP/GADD153 in endoplasmatic reticulum stress. *Cell death Differ.* 11, 381-389

P

PAN G, O'ROURKE K, CHINNAIYAN AM, GENTZ R, EBNER R, NI J, DIXIT VM.: The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. [Journal Article] *Science*. 276(5309):111-3, **1997a**

PAN G, NI J, WEI YF, YU G, GENTZ R, DIXIT VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL.[see comment]. [Journal Article] *Science*. 277(5327):815-8, **1997b**

PAN G, NI J, YU G, WEI YF, DIXIT, VM TRUND D: a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. [Journal Article] *FEBS Letters*. 424(1-2):41-5, **1998**

PAPATHANASSOGLOU ED, MOYNIHAN JA, VERMILLON DL, MCDERMOTT MP, ACKERMANN MH. Soluble fas levels correlate with multiple organ dysfunction severity, survival and nitrate levels, but not with cellular apoptotic markers in critically ill patients. *Shock*. 14(2):107-12, **2000** Aug

PAPATHANASSOGLOU ED, MOYNIHAN JA, MCDERMOTT MP, ACKERMAN MH: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med* 29:709-718, **2001**.
Elektronische Kataloge Full Text Bibliographic Links

PARSEY MV, KANEKO D, SHENKAR R, ABRAHAM E. (**1999**) Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1 β . *Clin. Immunol.* **91**, 219–225.

PATEL BM, CHITTOCK DR, RUSSELL JA, WALLEY KR (**2002**) Beneficial effects of short-term vasopressin infusion during severe septic shock. *Anaesthesiology* 96(3): 576-582

PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT Internet, **2008**

PAXIAN M, BAUER I, RENSING H, JAESCHKE H, MAUTES AE, KOLB SA, WOLF B, STOCKHAUSEN A, JEBLICK S, BAUER M (**2003**) Recovery of hepatocellular ATP and “pericentral apoptosis” after hemorrhage and resuscitation. *FASEP J* 17(9):993-1002

PAXIAN M, KELLER SA, CROSS B, HUYNH TT, CLEMENS MG. High resolution visualization of oxygen distribution in the liver in vivo. *Am J Physiol.* **2004**;286:G37–G44.

POWELL WC, FINGLETON B, WILSON CL, BOOTHBY M, MATRISIAN LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* **1999**;9: 1441–1447.

PSCHYREMBEL *Klinisches Wörterbuch* 259.Auflage de Gruyter ISBN 3-11-017213-5

R

RAFFERTY JF, NOGUCHI Y, FISCHER JE et al: Sepsis in rats stimulates cellular proliferation in the mucosa of the small intestine. *Gastroenterology* **1994**; 107:121-127

REED JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776 (1997)

REED JC (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111–121

RENSING H, BAUER I, DATENE V, PATAU C, PANNEN BH, BAUER M (1999) Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 27:2766–2775

RENSING H, BAUER I, PÄTAU C, ZHANG JX, PAXIAN M, PANNEN BH, YOKOYAMA Y, CLEMENS MG, BAUER M (2002) Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology* 36(6):1453-1465

RENSING H, BAUER M (2001) Multiorganversagen. Mechanismen, klinische Manifestationen und Therapiestrategien. *Anaesthesist* 50:819-841

RIEDEMANN NC, GUO RF, WARD PA, (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112(4):460-467

RIMONDI E, SECCHIERO P, QUARONI A, ZERBINATI C, CAPITANI S, ZAULI G. Involvement of TRAIL-/TRAIL-receptors in human intestinal cell differentiation. *J Cell Physiol* **2005**

ROBERG K: **2001**. Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab. Invest.* 81:149–158.

ROBERTSON JD, GOGVADZE V, KROPOTOV A, VAKIFAHMETOGLU H, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. (2004). *EMBO Rep* 5: 643–648.

ROTH GA, KRENN C, BRUNNER M, MOSER B, PLODER M, SPITTLER A, PELINKA L, SAUTNER T, WOLNER E, BOLTZ-NITULESCU G, ANKERSMIT HJ: Elevated Serum levels of epithelial cell apoptosis-specific cytokeratin 18 neoepitope M30 in critically ill patients. *Schock* 22,3:218-220, **2004a**

ROTH E, HANSPETER P (2004b) IFN γ promotes Fas ligand- and perforin-mediated liver cell destruction by cytotoxic CD8 T cells. *J Immunol* 172, 1588-1594

RUEMMELE FM, BEAULIEU JF, DIONNE S et al: Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumor necrosis factor α . *Gut* **2002**; 51:842-848

S

SAKKA SG, REINHART K, MEIER-HELLMANN A (2002) Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest* 122:1715-1720

SALVESEN GS, DUCKETT CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:401–410

SAVILL J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **1997**; 61:375-380

SAX JK, FEI P, MURPHY ME, BERNHARD E, KORSMEYER SJ, EL-DEIRY WS. (2002). Nat Cell Biol 4: 842–849.

SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER P, PETER ME. (1998): Two CD 95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EBMO J 17, 1675-1687

SCHMIDT LE, SORENSEN VR, SVENDSON LB, HANSEN BA, LARSEN FS (2001)
Hemodynamic changes during a single treatment with the molecular adsorbent recirculating system in patients with acute-on-chronic liver failure. Liver Transpl 7:1034-1039

SCHNEIDER P, HOLLER N, BODMER JL, HAHNE M, FREI K, FONTANA A, TSCHOPP J 1998 Conversion of membrane bound fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with down regulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. J Exp Med 187:1205–1213

SCHRODER M, KAUFMAN RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 74: 739–789

SCORRANO L, OAKES SA, OPFERMAN JT, CHENG EH, SORCINELLI MD, POZZAN T, KORSMEYER SJ (2003) Bax und Bak regulation of endoplasmatic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. Science 300: 135-139

SECCHIERO P, ZERBINATI C, RIMONDI E, CORALLINI F, MILANI D, GRILL V, et al. TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. Cell Mol Life Sci 2004;61: 1965–74

SERRAO, K. L., FORTENBERRY, J. D., OWENS, M. L., HARRIS, F. L., BROWN, L. A. (2001) Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 280, L298–L305.

SIEGEL JH, GOODZARI S, GUADELUPI P et al.(1993) the host defese to trauma and sepsis: multiple organ failure as a manifestation of host defense failure disease. In: SCHLAG G, REDL H (Hrsg) Pathophysiology of shock, sepsis, and organ failure. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 626-664

SIPAHI T, POCANH, AKAR N. Effects of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis. Clinical & Applied thrombosis/Hemostasis 12(1):47-54, 2006 Jan

SMYTH MJ, TAKEDA K, HAYAKAWA Y, PESCHON JJ, VAN DEN BRINK MR, YAGIDA H. Nature`s TRAIL-on a path to cancer immuotherapy. Immunity 2003;18:1-6

SORENSEN TI, NIELSEN GG, ANDERSEN PK, TEASDALE TW (1988) Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. N Engl J Med 318(12): 727-732

STOKA V et al. Lysosomal proteast pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route. J.Biol.Chem. 276, 3149-3157 (2001).

SUSIN SA et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducin facto. Nature 397, 441-446 (1999)

SZEGEZDI E, FITZGERALD U, SAMALI A (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. Ann NY Acad Sci 1010: 186–194

T

TANEJA R, PARODO J, KAPUS A, et al: Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ M) and reduced caspase-9 activity. *Crit Care* ed **2004**; 32: 1460-1469

TANNAHILL CL, FUKUZUKA K, MARUM T, et al. Discordant tumor necrosis factor- α superfamily gene expression in bacterial peritonitis and endotoxemic shock. *Surgery*. **1999** 126:349-357

TECCIO C, HUBER V, SCAPINI P, CALZETTI F, MARGOTTO D, TODESCHINI G, et al. IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing factor (TRAIL/Apo2-ligand) displaying apoptotic activity on leucemic cells. *Blood* **2004**; 103; 3837-44

THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2000**; 342:1301–1308

TINEL A & TSCHOPP J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846 (**2004**)

TTTHERADGE MA (**1999**) Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 437-455

U

URANO F, WANG X, BERTOLOTTI A, ZHANG Y, CHUNG P, HARDING HP, RON D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**:664–666, (**2000**).

V

VANHOREBEEK J, DeVAS R, WOUTERS PJ, DeWOLF-PEETERS C, VAN DEN BERGHE G. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insuline in critical ill patients. *Lancet* **2005**; 365: 53-9

VINCENT JL, MORENO R, TAKALA J, WILLATS S, DE MEONCA A, BRUINING H, REINHARDT CK, SUTER PM, THIJS LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive care med*. Jul 22(7): 707-10, **1996**

VINCENT JL, DE MEDONCA A, CANTRAINE F, MORENO R, TAKALA J, SUTER PM, SPRUNG CL, COLARDYN F, BLECHER S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units:results of a multicenter, prospective study. *Crit care med*. **1998** 26 (11):1767-8

W

WAGENER C.(**1999**) Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumore. Thieme Verlag, 2.veränderte Auflage

WANG SD, HUANG KJ, LIN YS, LEI HY (1994) Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 152:5014-5021

WARE LB, MATTHAY MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* **2000**; 342:1334-1349

WATANABE-FUKUNAGA R, BRANNAN C, ITOH N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* **1992**; 148:1274-1279

WEBER SU, SCHEWE JC, PUTENSEN C, STUBER F, SCHRODER S. Apoptosis as a pathomechanism of sepsis. *Anaesthesist* **2004** Jan;53(1):59-65 ISSN:0003-2417

WESCHE DE, LOMAS-NEIRA JL, PERL M, CHUNG CS, AYALA A: Leucocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* Vol 78 325-337, **2005**

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. (1980) Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29, 189–201.

WOODCOCK NP, SUDHEER V, EL BARGHOUTI N, PERRY EP, MACFIE J (2000) Bacterial translocation in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 87:439–442

WU GS. et al., BURNS TF, MCDONALD ER, 3RD, JIANG W, MENG R, KRANTZ ID, KAO G, GAN DD, ZHOU JY, MUSCHEL R, HAMILTON SR, SPINNER NB, MARKOWITZ S, WU G. and el-DEIRY WS. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [letter]. *Nat Genet*, 17, 141-3.

WYLLIE, A.H., KERR, J.F. AND CURRIE, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.

X

XIA QIN, SHI SHUXIAN. Study on FAS/FAS-L Expression in Liver Tissue and Hepatocyte Apoptosis in Patients with Hepatis Gravis. *Journal of Tongji Medical University* 21(2), 112-114 (2001)

Y

YANG S, KOO DJ, ZHOU M, CHAUDRY IH, WANG P. Gut derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2000**; 279: G1274-G1281

YUAN XM et al. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6286-6291 (2002)

YUROVSKY VV. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand enhances collagen production by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2003**;28:225–31.

Z

ZHOU M, SIMMS HH, WANG P. (2004) Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 attenuate vascular endothelial cell apoptosis in sepsis. *Ann. Surg.* **240**, 321–330.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. med. M. Bauer, PD Dr. med. M. Paxian, Dr. med. G. Paxian, Prof. Dr. med. F. Brunkhorst, MTA Edith Walther, Doktorantin Susann Köhler, Dr. rer. nat. Oberle,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gerthausen, den 20.12.2009

Madeleine Masuch

Lebenslauf

Persönliche Daten

Madeleine Masuch
geboren am 30.06.1979 in Meiningen

Schulbildung

	1986 - 1990
Grundschule Untermaßfeld	1990 - 1992
Regelschule Untermaßfeld	1992 - 1998
Moritz-Seebeck- und Henfling-Gymnasium in Meiningen	
Abschluss: Abitur, Note: „gut“	

Ausbildung

1998 - 2001

Medizinisch-technische-Laborassistentin
Gesamtnote schriftlich: „gut“
Gesamtnote mündlich: „sehr gut“
Gesamtnote praktisch: „gut“

Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Vorklinik	05.09.2003	2001-2003
Physikum, Gesamtnote „befriedigend“ (2,6)		
		2003-2007

Klinischer Abschnitt

Famulaturen

Pathologie, Institut für Pathologie, Meiningen Dr. Lüftner	02/2004 - 03/2004
Intermediate Care, Klinikum Meiningen OÄ Dr. Hauptmann	03/2004 - 04/2004
Neurologie, Klinikum Meiningen CA Dr. Banzhaf	09/2004 - 10/2004
Klinische Anästhesie, Allgemeinchirurgie, Unfall-, MGK-Chirurgie Universitätsklinik Jena, Prof. Dr. Bauer	02/2005 - 03/2005

Abschluss des Studiums

Gesamtnote „sehr gut“

13.11.2007

Arbeitsverhältnis/Facharztausbildung

Beginn des Arbeitsverhältnisses in der Geriatrischen
Fachklinik Meiningen im Rahmen der Ausbildung zum
Hausarzt/Facharzt Innere Medizin

ab 11/2007

Familie

07/2009-01/2011

Beginn des Mutterschutzes und Geburt unseres Sohnes
Alec Masuch am 16.08.2009

Gerthausen, den 20.12.2009

Madeleine Masuch

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Bauer für die Vergabe des interessanten Themas. Neben meinem Doktorvater möchte ich auch Herrn Oberarzt Dr. med. habil. M. Paxian und Frau Dr. med. G. Paxian für die Hilfe und Anregung bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit, sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen zu den erhaltenen Ergebnissen danken.

Ein Dankeschön auch an alle Patienten und deren Angehörige, die trotz ihrer schweren Situation ihr Einverständnis für die Studienteilnahme erklärt haben. Danke auch an Prof. Dr. med. K. Reinhart und Prof. Dr. med. F. Brunkhorst für die Schaffung der umfangreichen Datenbank, die eine wichtige Grundlage dieser Arbeit war. Ich hoffe, dass die Ergebnisse dieser Arbeit zur Verbesserung der Prognose der Patienten mit Multiorganversagen beitragen können.

Für die Hilfe im Labor danke ich Fr. Dr. med. Gudrun Paxian und unserer MTA Edith Walther, ganz besonders aber meiner lieben Freundin und Mit-Doktorandin Susann Köhler, für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die Motivation und den Spaß bei der Arbeit. Herrn Dr. A. Claus möchte ich für die organisatorische Hilfe im Labor danken.

Dr. Oberle und Dr. med. Paxian danke ich für die Unterstützung beim Arbeiten mit Sigma Plot und anderen Computerproblemen, Dr. med. Kortgen für die kritischen Verbesserungsvorschläge.

Ein ganz herzliches Dankeschön an meine Eltern, die mich in meiner Entscheidung, Medizin zu studieren, jederzeit unterstützt haben. Meiner Mutter Andrea Masuch besonderen Dank für die zahlreichen Korrekturlesungen zur Beseitigung der Rechtschreibfehler.

Meinem Partner Andreas March möchte ich für die Anregungen und Korrekturvorschläge danken, die diese Arbeit reizvoller machen sollen und für das Interesse am Thema.

Abschließend möchte ich auch meinem lieben Opa Gerhard danken, der immer an meine Fähigkeiten geglaubt hat und somit eine große Bedeutung für meinen Lebensweg hatte. Ich bin traurig, dass er den Moment des Abschlusses dieser Arbeit und das Aufwachsen seines Urenkels Alec nicht mehr mit uns teilen kann. Ihm möchte ich diese Arbeit in Erinnerung widmen.